

Miljøprojekt Nr. 718 2002

# Afgivelse af organisk stof fra polymere materialer - mikrobiel vækst

Charlotte Bettina Corfitzen, Hans-Jørgen Albrechtsen og  
Erik Arvin  
Miljø og Ressourcer, Danmarks Tekniske Universitet

Claus Jørgensen og Rasmus Boe-Hansen  
DHI - Institut for Vand og Miljø

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

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

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

# Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	9
1 INDLEDNING	11
1.1 BAGGRUND	11
1.2 FORMÅL	13
2 EKSISTERENDE METODER TIL BESTEMMELSE AF EFTERVÆKSTPOTENTIALE	15
3 UDVIKLING AF METODE	19
3.1 AOC-METODEN	19
3.2 METODEOVERVEJELSER	20
3.2.1 <i>Testvand</i>	20
3.2.2 <i>Mængde af testmateriale</i>	21
3.2.3 <i>Forbehandling af testmateriale</i>	21
3.2.4 <i>Ballastmateriale</i>	22
3.2.5 <i>Ekstraktionsmetode</i>	22
3.3 TESTMETODE	22
3.3.1 <i>Arbejdsgang</i>	22
3.3.2 <i>Databehandling</i>	24
3.3.3 <i>Gennemsnitlig vækstkurve</i>	25
4 EKSTRAKTIONSMETODER	27
4.1 FØRSØGSGANG	27
4.1.1 <i>Ekstraktion uden aktive bakterier</i>	27
4.1.2 <i>Ekstraktion med P17 og NOX</i>	27
4.1.3 <i>Ekstraktion med en naturlig population</i>	28
4.2 RESULTATER	30
4.2.1 <i>Ekstraktion uden aktive bakterier</i>	30
4.2.2 <i>Ekstraktion med P17 og NOX</i>	32
4.2.3 <i>Ekstraktion med en naturlig population</i>	34
4.2.4 <i>Diskussion</i>	38
5 DESINFEKTION AF TESTMATERIALE	41
5.1 FØRSØGSGANG	41
5.2 RESULTATER	44
5.3 DISKUSSION	46
6 SEKVENTIELLE EKSTRAKTIONER	47
6.1 FØRSØGSGANG	47
6.2 RESULTATER	48
6.3 DISKUSSION	50
7 S/V-FORHOLD	53
7.1 FØRSØGSGANG	54

7.1.1	<i>S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup></i>	54
7.1.2	<i>S/V-forhold i intervallet 0,06-1,38 cm<sup>-1</sup></i>	54
7.2	RESULTATER	55
7.2.1	<i>S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup></i>	55
7.2.2	<i>S/V-forhold i intervallet 0,07-1,38 cm<sup>-1</sup></i>	57
7.3	DISKUSSION	60
8	UNDERSØGELSE AF UDVALGTE MATERIALER	63
9	MODELLERING AF AOC-DATA	69
9.1	MODELLERINGEN	69
9.2	MODELLERINGSRESULTATER	70
10	SAMLET DISKUSSION	75
11	KONKLUSION	81
12	ORDLISTE	83
13	REFERENCER	85

Bilag A:	Materiale oversigt
Bilag B:	R <sub>z</sub> A-agar
Bilag C:	AOC-metoden
Bilag D:	Akkumulerede kurver for sekventielle ekstraktioner
Bilag E:	Data fra materialeundersøgelsen
Bilag F:	ATP; princip og metode
Bilag G:	Desinfektionsundersøgelse
Bilag H:	Rådata

# Forord

I 1997 vedtog Folketinget en tilskudsordning til at støtte bevarelsen af den decentrale vandforsyningsstruktur. Herunder blev der afsat midler, som blev anvendt til "Programmet til sikring og forbedring af drikkevandskvaliteten". Programmets primære formål var at udbygge den eksisterende viden om faktorer, der påvirker drikkevandets kvalitet, fra det bliver indvundet, behandlet på vandværket, og til det bliver distribueret til forbrugerne.

I 1998 blev projektet "Undersøgelser af materialers evne til mikrobiologisk vækst ved laboratorieforsøg" sendt i udbud. Projektet blev udført af IMT - Institut for Miljøteknologi\*, DTU i samarbejde med VKI\*\*. Hans-Jørgen Albrechtsen, IMT, var projektleder med Erik Arvin og Charlotte Bettina Corfitzen, IMT, samt Claus Jørgensen og Rasmus Boe-Hansen, VKI, som øvrige deltagere.

Styregruppen bestod af Linda Bagge (formand) og Janne Forslund, Miljøstyrelsen, Jørgen Beck fra Sjælsø Vandværk, Søren Lind fra Københavns Vand og Anders Vestergaard fra Uponor, som repræsentant for plastproducenterne.

IMT og Miljøstyrelsen ønsker at takke de involverede plastproducenter for deres hjælp med bidrag af materialer, Lyngby vandværk for et godt samarbejde og Helle Holst, IMM - Institut for matematisk modellering, DTU, for hjælp med spørgsmål angående den statistiske behandling af data.

---

\* Fra 2001: E&R, DTU - Miljø & Ressourcer, DTU. Sammenslutning af IMT - Institut for Miljøteknologi, IGG - Institut for Geologi og Geoteknik og ISVA - Institut for Strømningsmekanik og Vandressurser.

\*\* Fra 2000: DHI - Institut for Vand og Miljø. Sammenslutning af VKI og DHI - Dansk Hydraulisk Institut.



# Sammenfatning og konklusioner

Dansk drikkevand er generelt af meget høj kvalitet og indeholder kun relativt få mikroorganismer, når det forlader vandværket. Indholdet af mikroorganismer kan dog stige undervejs til forbrugeren; hvilket betegnes som mikrobiologisk eftervækst. Denne eftervækst i distributionssystemet er overvejende styret af faktorer som opholdstid, temperatur og mængde af tilgængeligt substrat. Da størstedelen af mikroorganismene i drikkevandssystemer er heterotrofe bakterier, er mængden af organisk kulstof således oftest den begrænsende faktor for bakterievæksten. Bakterier kan dog umiddelbart kun udnytte en mindre fraktion af det organiske stof til vækst, hvilket betegnes Assimilerbart Organisk Kulstof (AOC). Dels er der AOC i vandet, når det forlader vandværket, dels kan der tilføres AOC under distribution ved brud eller ved afgivelse fra anvendte materialer, fx polymerer. Polymere materialer (plasttyper) har i stigende grad vundet indpas i vandforsyningen, både i distributionsnettet og i husinstallationer og i fremtiden forventes 75% af ledningsnettet at udgøres af PE og 19% af PVC.

Formålet med dette projekt har været at undersøge, om der afgives mikrobielt tilgængeligt organisk kulstof fra polymere materialer, og om denne afgivelse er væsentlig i forhold til det generelle niveau i dansk drikkevand. Dette er blevet undersøgt ved at bestemme AOC-afgivelsen til vand i kontakt med materialet.

En væsentlig del af projektet fokuserede på at udvikle en egnet metode, med hovedvægten på en strategi, hvor afgivelsen blev målt over to trin:

1. Ekstraktion uden bakterier tilstede
2. Efterfølgende AOC-bestemmelse på ekstraktet

Materialerne blev ekstraheret ved nedsænkning i testvand i testflasker. I modsætning til andre undersøgelser, hvor afgivelsen fra materialer er blevet undersøgt ved opfyldning af rør, gav den her benyttede tilgang mulighed for at undersøge andre komponenter end rør, fx fittings. Ved at ekstrahere materialet uden at have bakterierne tilstede, kunne ekstraktionsforholdene vælges vilkårligt uden hensyn til bakterierne vækstkrav: Der kunne benyttes høj/lav temperatur, kloreret testvand, høj/lav pH osv. Efter endt ekstraktion blev materialet fjernet og AOC-indholdet i ekstraktet blev bestemt med en let modificeret AOC-bestemmelse, idet de sterile ekstrakter kun blev podet med bakteriestammen P17. Under inkuberingen ved 15°C blev kimtallet for P17 bestemt på R<sub>2</sub>A-agar, og det maksimale kimtal blev omsat til en AOC-værdi ved at benytte en udbyttekonstant for bakteriernes vækst på acetat.

Inden ekstraktionen blev materialestykkerne rensed ved 24 timers henstand i postevand med 1 times skylning i postevand. Herefter blev bakterier på materialeoverfladerne inaktiveret ved pasteurisering, inden materialet blev overført til pasteuriseret testvand, hvor det blev ekstraheret.

Under optimeringen af metoden blev en række parametre undersøgt:

- Ekstraktionstemperatur
- Ekstraktionstid
- Forhold imellem materialernes overfladeareal og vandvolumen (S/V forhold)

- Omrystning under ekstraktionen

Forlænget ekstraktionstid forøgede afgivelsen. Ligeledes øgede omrystning under ekstraktionen afgivelsen fra materialet med ca. 50%. En øget mængde materiale, og dermed et øget overfladeareal af materialet, i samme volumen (større S/V forhold) gav stigende AOC-værdi i vandfasen indtil et vist S/V forhold, over hvilket AOC-afgivelsen ikke blev forøget. Når afgivelsen blev omregnet til en flux-værdi ( $\mu\text{g acetat-C/døgn/cm}^2$ ) var der omvendt proportionalitet mellem S/V forhold og fluxen.

Det viste sig vanskeligt at inaktivere den naturlige population på materialernes overflader. Forskellige pasteuriseringsforhold og kloring blev undersøgt, men det viste sig nødvendigt og hensigtsmæssigt i hvert tilfælde efter endt ekstraktion at kontrollere, om ekstraktet var kontamineret med uønskede bakterier. Måling af adenosine triphosphate (ATP) viste sig i kraft af hurtige analyse og høj følsomhed at være en velegnet metode.

Desuden kunne ATP-måling alternativt benyttes til at måle vækstkurver for P17, idet der var god overensstemmelse imellem vækstkurver for P17 målt ved kintal og ATP.

På baggrund af de indledende undersøgelser blev testmaterialerne ekstraheret i 15 døgn ved 20°C under omrystning. Der blev undersøgt fem polymere materialer: to PEM materialer (sort og blåt) og tre PVC materialer (med henholdsvis bly, zink/calcium og organiske stabilisatorer), hvilket resulterede i flux-værdier på  $3,5-5,5 \times 10^{-3} \mu\text{g acetat-C/døgn/cm}^2$ .

De opnåede resultater og betydningen af S/V-forhold kan teoretisk relateres til, at der i hovedledninger kan afgives  $< 1 \mu\text{g acetat-C/L/døgn}$ , i forsyningsledninger  $1-3 \mu\text{g acetat-C/L/døgn}$  og i stikledninger/husinstallationer  $3 \mu\text{g acetat-C/L/døgn}$ . En undersøgelse foretaget på 9 danske vandværker (Jørgensen et al., 2002) viste, at AOC-indholdet i vandet fra vandværket var grupperet omkring henholdsvis  $4-6 \mu\text{g acetat-C/L}$  og  $20-39 \mu\text{g acetat-C/L}$ . Afgivelser fra de polymere materialer vil have mindre betydning i vand fra den sidste gruppe, men ved længere opholdstider (fx i forsyningsledninger til landlokaliteter eller stillestående vand i en husinstallation over en weekend) vil afgivelserne kunne mere end fordoble vandets AOC-indhold i vand fra den første gruppe.



# Summary and conclusions

Danish water supply is based on ground water treated without disinfectants. The treated water has in general low bacterial numbers when leaving the water works, but this does not necessarily ensure low bacterial numbers at the consumers tap. Throughout the distribution network the concentration of bacteria in the water is likely to increase, a phenomenon called bacterial regrowth. This regrowth is mainly controlled by retention time, temperature and level of biodegradable substrate. In drinking water the main part of the bacteria is heterotrophic and thus the concentration of organic carbon often will be the limiting growth factor. The bacteria can only assimilate and grow on a minor fraction of the total organic carbon, which is called Assimiable Organic Carbon (AOC). Some AOC will be present in the water when leaving the water works, but the concentration may increase in connection with leaks in the pipe system or by release from the materials of the distribution system. The use of polymeric materials (plastic) in distribution systems is still increasing, and it is expected that 75% of the pipe system will consist of PE and 19% of PVC in the near future.

The purpose of this project was to evaluate the significance of biodegradable substrate migrating from polymeric materials compared to levels of AOC in drinking water in general. This was evaluated by measuring the AOC migrating into water in contact with the materials.

A major part of the project focused on developing a suitable method with the main efforts on a two-step procedure to determinate the migration:

1. Extraction without bacteria
2. Subsequent AOC-measurement of the extract

The materials were extracted by submerging pieces of the material into water. In this way the method could be used to test other components besides pipes, e.g. fittings. By extracting the materials without bacteria, the extraction condition could be set without regarding the growth conditions for the bacteria: E.g. high/low temperature, chlorinated water, high/low pH. After the extraction the material pieces were removed and the AOC concentration in the extract was measured. In this project a slightly modified AOC measurement was used: The sterile extracts were only inoculated with P17 and incubated at 15°C. During incubation the numbers of P17 were determined by plate counts using R<sub>2</sub>A-agar. The maximum bacterial number was converted into an AOC value by a yield constant for growth of the bacteria on acetate.

Before extraction the material pieces were rinsed by 24 hours retention in potable water followed by rinsing in running potable water for 1 hour. The material pieces were afterwards pasteurised in potable water to inactivate the bacteria on the material surfaces. The material pieces were then transferred into pasteurised test water for extraction.

While optimising the method the following parameters were evaluated:

- Temperature for the extraction
- Extraction time

- The ratio between material surface and water volume (S/V ratio)
- Shaking during extraction

Extended extraction time resulted in an increased migration. Shaking during extraction also increased the migration with approximate 50%. An increased amount of material giving an increased surface area of the material in the same volume of test water (increased S/V ratio) resulted in an increased AOC value, until a certain S/V ratio above which no further substantial increase in migration was observed. Expressing the migration as a flux ( $\mu\text{g acetat-C/day/cm}^2$ ), the flux was inversely proportional to the S/V ratio.

It was sometimes a problem to inactivate all the bacteria present on the materials surfaces. Different types of pasteurisation and chlorination were tested, but it became necessary and appropriate in each case after the extraction to test if bacteria have contaminated the extract. Measurements of adenosine triphosphate (ATP) proved to be an effective method due to its rapid analysis and high sensitivity.

Furthermore, ATP measurement could be used to measure growth curves for P17 because of the good accordance between growth curves measured by CFU and ATP.

The initial investigations lead to a procedure where materials were extracted for 15 days at 20°C with shaking. Five polymeric materials were tested: Two PE materials (black and blue) and three PCV materials (with respectively lead, zinc/calcium or organic stabilizers), which resulted in flux values in the range  $3.5\text{-}5.5 \times 10^{-3} \mu\text{g acetat-C/day/cm}^2$ .

The obtained results and the observed effect of S/V ratios can theoretically be related to a release from the materials of  $<1 \mu\text{g acetate-C/L/day}$  in main pipes,  $1\text{-}3 \mu\text{g acetate-C/L/day}$  in supply pipes and  $3 \mu\text{g acetate-C/L/day}$  in service pipes/house installations. A survey involving 9 Danish water works (Jørgensen et al., 2002) showed, that the general AOC content in treated water was grouped around values of  $4\text{-}6 \mu\text{g acetate-C/L}$  and  $20\text{-}39 \mu\text{g acetate-C/L}$ . Migrations from polymer materials will be of less importance in water types from the last group. In water types from the first group, prolonged retention times (e.g. supply pipes to rural districts or stagnant water in a house installation over a weekend) may more than double the waters AOC concentrations due to release from materials.

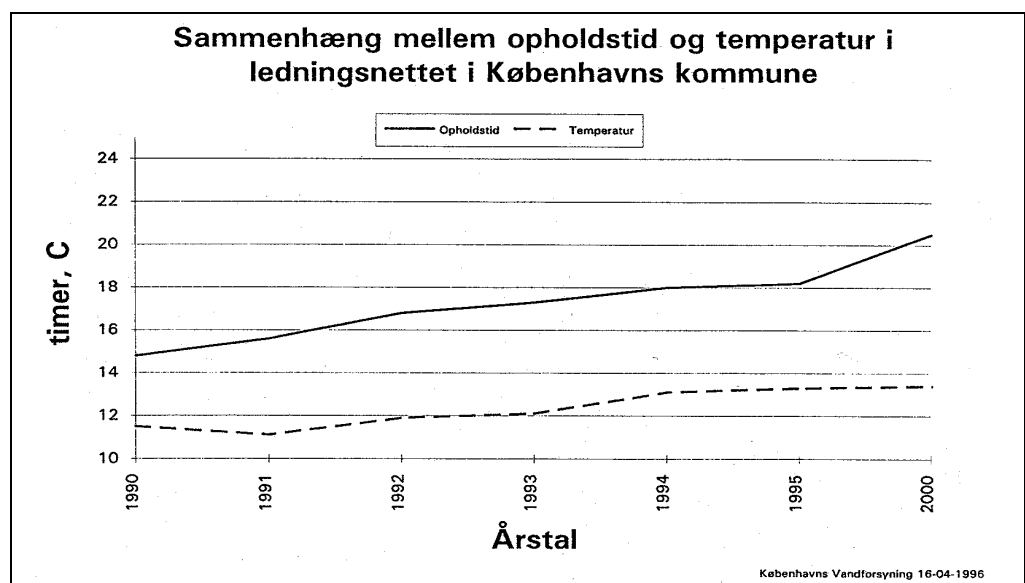
# 1 Indledning

## 1.1 Baggrund

Langt størstedelen af den danske vandforsyning er baseret på grundvand af høj kvalitet, der kun gennemgår en begrænset behandling uden desinfektion, inden det ledes ud i distributionsnettet. Der er relativt få mikroorganismer i det færdigtbehandlede vand, men indholdet af mikroorganismer vil kunne stige undervejs til forbrugeren. Denne stigning i koncentrationen af bakterier fra vandværk til forbruger kaldes mikrobiel eftervækst.

Mikrobiel eftervækst er uønsket, da en øget biomasse i distributionsnettet kan øge risikoen for overlevelse af patogener og samtidig forringe vandkvaliteten med hensyn til lugt, smag og farve. Da størstedelen af biomassen vil sidde på de indvendige flader som en biofilm, vil der desuden være risiko for nedbrydning af installationsmaterialerne.

Mængden af tilgængeligt substrat, temperaturen og opholdstiden i distributionsnettet har indflydelse på antallet af mikroorganismer. Temperaturen og opholdstiden har i de seneste år været stigende som følge af det faldende vandforbrug (Figur 1), hvilket har øget risikoen for eftervækst. Langt størstedelen af mikroorganismene i drikkevand er bakterier, som overvejende vil være heterotrofe. Heterotrofe bakterier kan generelt siges at behøve C, N og P i forholdet 100:10:1 /van der Kooij et al., 1982/, og indholdet af organisk kulstof er således oftest den begrænsede faktor for bakterievækst i drikkevand. Det er dog kun en mindre del af den totale mængde organiske kulstof (Total Organic Carbon, TOC) bakterierne kan optage og udnytte (assimilere). Den fraktion, som bakterierne kan assimilere (Assimilable Organic Carbon, AOC), vil normalt udgøre 0,1-10% af TOC /Hem et al., 1997/.



Figur 1: Sammenhæng mellem opholdstid og temperatur i ledningsnettet i Københavns kommune /DVF, 1998/.

Første trin i en kontrol af eftervækst er at sikre, at det færdigtbehandlede vand har et lavt AOC-indhold, når det forlader vandværket. Van der Kooij et al. /1995/ anfører som tommelfingerregel, at vand med et AOC-indhold på under 10 µg C /L kan karakteriseres som biologisk stabilt, hvilket vil sige, at bakterietallet ikke øges i distributionsnettet. AOC kan blive tilført distributionsnettet ved brud på ledningsnettet og ved afgivelse fra anvendte materialer, hvorved der vil kunne forekomme eftervækst, selvom vandet fra vandværket er biologisk stabilt.

Ledningsmateriale	Materialefordeling i eksisterende ledningsnet 1994		Forventet fremtidig materialeanvendelse
	%	Km	%
PVC	41	6.003	19
PE	7	1.025	75
Gråt støbejern	35,5	5.198	1
Duktilt støbejern	3	439	2
Stål	2	293	0,5
Bonna (armeret cement)	3	439	-
Eternit (asbestcement)	8	1.172	0,5
Andet	0,5	73	2
Ialt	100	14.64	100

Tabel 1: Materialefordeling i ledningsnettet. Tal er baseret på spørgeskemaundersøgelse på 44 af de største vandforsyninger repræsenterende ca. 45% af den samlede udpumpede vandmængde /DVF, 1995/. - : forventes ikke anvendt.

I Danmark udgøres ledningsnettet primært af rør af støbejern eller polymere materialer. Husinstallationer, fittings og andre smådele har hidtil været domineret af galvaniseret jern, kobber og messing, men vil i nyere installationer primært være af polymere materialer. I Tabel 1 er angivet den eksisterende og den fremtidige, forventede materialefordeling baseret på tal fra Danske Vandværkers Forening. Tabellen stemmer godt overens med 1993-tal fra Odense vandforsyning (PVC: 50,9%; PE: 3,5%; gråt støbejern: 24,1% /Lorenzen, 1993/) mens gråt støbejern udgør en større andel af Københavns vands eksisterende ledningsnet (PVC: ikke angivet; PE: 5,3%; gråt støbejern: 66% /Københavns Vand, 1998/). Gråt støbejern og eternit vil med tiden blive udskiftet med andre materialer, da der er stor risiko for brud, og erfaringsmæssigt giver de to materialer anledning til problemer med belægninger, der reducerer trykket og giver snavset vand /Lorenzen, 1993/. Polymere materialer udgør således i stadig stigende grad en betydelig andel af det danske vandforsyningssystem.

Polymere materialer består sjældent af rene polymere, men indeholder en række additiver, som skal forbedre materialernes fysiske egenskaber eller lette fremstillingsprocessen. Additiver kan bl.a. være: fyldstoffer (f.eks. CaCO<sub>3</sub> i PVC), stabilisatorer (herunder antioxidanter, antiozonanter og UV absorbers), farvestoffer og smøremidler /Coulson, 1972 og Mascia, 1974/. Hver enkelt gruppe af additiver udgøres af et væld af forskellige organiske stoffer såvel som et mere begrænset antal uorganiske stoffer. Hvilke additiver, der tilsættes de enkelte produkter, varierer fra producent til producent, hvorfor en given materialetype fra forskellige producenter har forskellig sammensætning.

Når det polymere materiale er monteret i ledningsnettet eller i husinstallationer, kan monomerer, der ikke er blevet polymeriseret, og additiverne eller deres nedbrydningsprodukter blive afgivet (migrere) fra materialet til vandfasen. En del af disse stoffer vil kunne tjene som AOC-kilde for bakterierne. Den bakterievækst, som afgivelsen fra materialet medfører, angives som materialets eftervækstpotentiale.

## 1.2 Formål

Formålet med projektet var at undersøge, om afgivelsen af mikrobielt tilgængeligt organisk stof fra polymere materialer har betydning i forhold til generelle niveauer i dansk drikkevand. Det skulle undersøges, om en række polymere materialer kunne understøtte mikrobiologisk vækst ved bestemmelse af AOC afgivet til vand i kontakt med materialet. Dette nødvendiggjorde udviklingen af en metode til at bestemme polymere materials eftervækstpotentiale.

Ved projektets start var der lagt op til, at hovedvægten af arbejdet skulle koncentreres om selve afprøvningen af en lang række materialer, der udover rørmaterialer skulle omfatte fittings og andre smådele anvendt i vandforsyningen. Desuden skulle en række materialer testes med to forskellige vandtyper repræsentativt for dansk vandforsyning. For materialer, der udviste gode vækstmuligheder, skulle det endvidere undersøges, om legionella kunne overleve/vokse på stoffer afgivet fra materialerne. Under projektets afvikling blev det imidlertid klart, at der skulle anvendes større ressourcer på udviklingen af metoden, hvorfor det blev valgt at prioritere dette arbejde, og efterfølgende kun teste et mindre antal materialer. Materialer blev således kun testet med én vandtype, og der blev ikke foretaget test med legionella.



## 2 Eksisterende metoder til bestemmelse af eftervækstpotentiale

I forbindelse med transport af drikkevand foreligger der en CEN standard til bestemmelse af plastrørs migrationsværdier /DS/EN 852-1/. Ud fra denne standard kan migrationsværdier for lugt, smag, farve, TOC og specifikke stoffer, såsom phenol, bestemmes. Der findes ikke nogen international standard til bestemmelse af materialernes eftervækstpotentiale, men flere lande har nationale standarder. Dette betyder, at plastproducenterne skal bekoste afprøvninger nationalt i de lande, hvor de ønsker deres produkter godkendt. Dette er en stor udgift, som vil kunne mindskes betydeligt ved vedtagelse af en international/europæisk gældende standard. Vedtagelse af en sådan standard vil endvidere forenkle arbejdsgangen for brugerne af materialerne, da der ikke forud for brug skal undersøges, om det pågældende materiale er godkendt i det aktuelle land.

På nuværende tidspunkt er der et udviklingsarbejde i gang i CEN for at fastlægge en fælles europæisk standard til at bestemme eftervækstpotentiale for polymere materialer anvendt i vandforsyningssammenhæng. Fire metoder danner grundlag for dette arbejde:

- BS 6920, der fungerer som engelsk standard.
- DVGW W270, der fungerer som tysk standard.
- KIWA metoden, der er udviklet på KIWA instituttet i Holland.
- ÖKI metoden, der er udviklet på ÖKI instituttet i Østrig.

Parametre	BS 6920 Sec.2.4	DVGW W270	KIWA metode	ÖKI metode
Testperiode	7 uger	26 uger	16 uger	16 uger
Teststrategi	To vandskift per uge	To tretten ugers testperioder	Batch	Et vandskift per uge
Vandskifte	Semi-batch	Kontinuert	Batch	Semi-batch
Inokulum	Flodvand	Drikkevand	Flodvand	Drikkevand
Testvand	Afkloret drikkevand	Ukloret drikkevand	UKloret drikkevand	Afkloret drikkevand
Inkuberings- temperatur	30°C	Rum- temperatur	25°C	23°C
Overfladearea I af testmateriale	150 cm <sup>2</sup>	800 cm <sup>2</sup>	12×8 cm <sup>2</sup>	1257 cm <sup>2</sup> (1 m rør med D <sub>indre</sub> =4 cm)
Testvand volumen	1000 mL (S/V=0,15 cm <sup>-1</sup> )	Kontinuert flow	600 mL (S/V=0,16 cm <sup>-1</sup> )	1257 mL (S/V=1 cm <sup>-1</sup> )
Mikrobiel parameter for testvand	Opløst oxygen	Ingen	ATP	ATP og HPC
Mikrobiel parameter for testmateriale	Ingen	Biomasse volumen	ATP	ATP
Kontrol materialer	Paraffin voks, glas og rustfrit stål	Paraffin voks, glas og rustfrit stål	PTFE, glas, PCVC-P og rustfrit stål	Glas og PVC-P

Tabel 2: Opsummering af fire eksisterende metoder til bestemmelse af eftervækstpotentiale for polymere materialer anvendt i drikkevandsforsyningen / ÖKI, 2000/.

I Tabel 2 er de fire metoder opsummeret.

#### *BS 6920 /prEN/*

Testmaterialet inkuberes i glasbeholdere med testvand inokuleret med flodvand. Materialet inkuberes i 7 uger med 2 ugentlige vandskift. Inden vandskift i uge 5, 6 og 7 måles opløst oxygen i vandfasen. Gennemsnittet af forskellen imellem prøver og kontroller på de tre måletidspunkter: "Mean dissolved oxygen differens" anvendes som mål for materialets eftervækstpotentiale.

#### *DVGW W270 /prEN/*

Plader af testmaterialet anbringes i et kar, hvor testvandet tilføres i et kontinuert flow. Efter 13 ugers henstand optages pladerne, og den dannede biomasse skræbes af. Herefter sættes pladerne tilbage i karret, og proceduren gentages. Volumenet af den dannede biomasse i de to inkuberingsperioder anvendes som mål for materialets eftervækstpotentiale.

#### *KIWA metoden /prEN/*

Stykker af testmateriale inkuberes 112 døgn i Erlenmeyerkolber i testvand inokuleret med flodvand. Dag 56, 84 og 112 bestemmes biomassekoncentrationer på testmaterialet og i vandfasen ved måling af ATP. Gennemsnitlige ATP-koncentrationer for de tre målinger anvendes som mål for materialets eftervækstpotentiale.



### ÖKI metoden /Öki, 2000/

Rørstykker af testmaterialet fyldes med testvand. En gang hver uge skiftes vandet. Inden vandskift måles biomassekoncentrationen i vandfasen ved kimtalsbestemmelse og måling af ATP. Efter 3 måneders inkubering bestemmes biomassen på testmaterialets inderside ved måling af ATP. De løbende målinger på testvandet og den dannede biofilm anvendes som mål for eftervækstpotentialiet.

I det indledende arbejde under CEN blev BS 6920, DVGW W270 og KIWA metoden afprøvet på en række materialer for at sammenholde pass/fail for de tre forskellige metoder (Tabel 3). Der blev ikke fundet fuldkommen overensstemmelse imellem metoderne, end ikke imellem forskellige laboratorier, der udførte BS6920-metoden.

Materiale	BS6920				KIWA metoden	DVGW W270
	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D		
Gummi	Pass	Pass	Pass	Fail	Fail	Fail
Orange p-PVC	Fail	Pass	Fail	Fail	Fail	Fail
Sort PE	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Voks	Fail	Fail	Fail	Fail	Fail	Fail
EP Washers	Pass	Pass	Fail	Pass	Fail	NT

Tabel 3: Resultat af intern afprøvning i CEN sammenhæng af tre metoder til bestemmelse af polymere materials eftervækstpotentialer. Resultatet er opgivet ud fra de enkelte tests pass/fail kriterier. NT: ikke målt. /CEN, 1993/

Ingen af de fire metoder er designet med dansk vandforsyning for øje. Dansk vandforsyning adskiller sig fra det øvrige Europa ved, at mere end 99% af indvindingen er baseret på grundvand, der generelt ikke desinficeres. I udlandet er desinfektion ved brug af klorforbindelser langt mere udbredt og indholdet af N, P samt organisk stof (herunder også AOC) vil generelt være større end i dansk drikkevand. Det er derfor ikke repræsentativt for dansk drikkevand, at der i BS6920 og KIWA metoden inokuleres med flodvand, ligesom at forskellen i niveauet af næringssalte kan have indflydelse. Desuden er alle fire metoder meget tidskrævende i deres udførelse (7-26 uger), og kræver i større eller mindre grad specielt udstyr eller opstillinger.

I dette projekt er der anvendt en metode baseret på et andet princip end de ovenfor nævnte, idet hovedformålet har været at undersøge om afgivelsen af mikrobielt tilgængeligt substrat fra de polymere materialer er betydende i forhold til vandets indhold af substrat. Organisk mikrobielt tilgængeligt substrat i drikkevand bestemmes ofte som Assimilable Organic Carbon (AOC), og kvantificeringen af substrat afgivet fra materialer er derfor baseret på samme måleprincip.



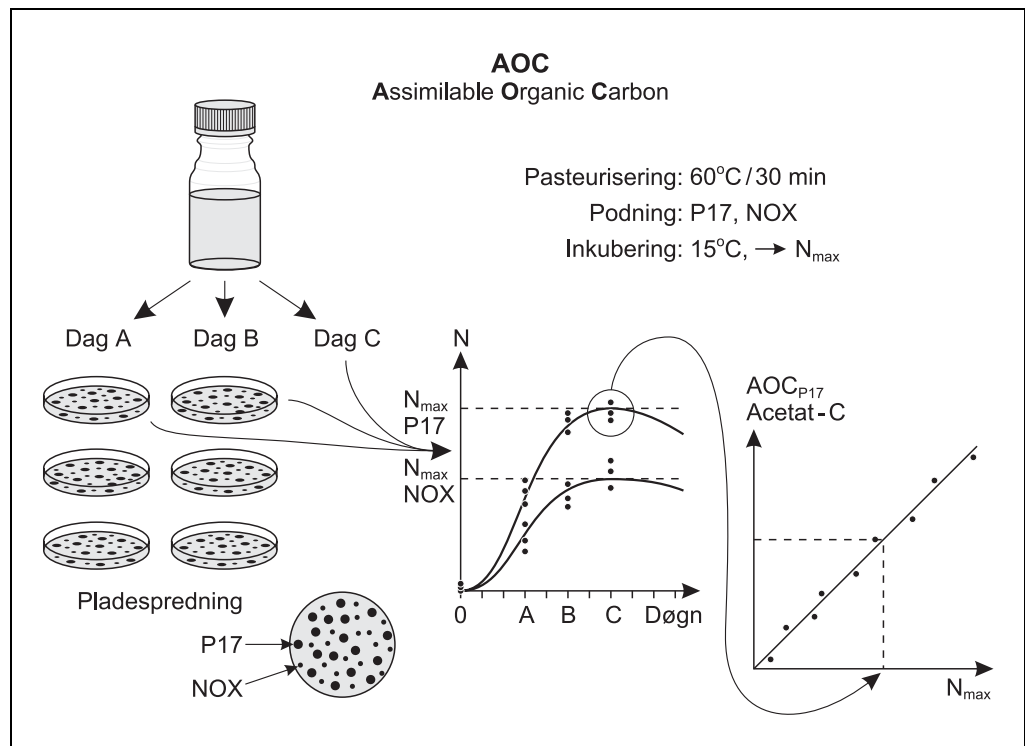
# 3 Udvikling af metode

Projektet tog udgangspunkt i, at fastlægge en metode til bestemmelse af polymere materials eftervækstpotentiale udtrykt som stigningen i AOC i en vandfase i kontakt med materialet.

Nedenfor er principperne for en ordinær AOC-bestemmelse gennemgået tillige med de parametre, der blev overvejet og undersøgt i forbindelse med at fastlægge en metode til at bestemme materialernes eftervækstpotentiale. Kapitlet afsluttes med en gennemgang af den endeligt benyttede metode. De undersøgelser, der blev udført for at afklare de forskellige parameters betydning, er gennemgået i kapitel 4 - 7. I Bilag A er angivet en oversigt over de materialer, der blev anvendt i projektets eksperimentelle arbejde.

## 3.1 AOC-metoden

Metoden til at bestemme Assimilable Organic Carbon (AOC) blev udviklet i starten af 80'erne af hollænderen D. van der Kooij til at bestemme AOC i drikkevand, hvor koncentrationerne måles i  $\mu\text{g/L}$ . Metoden har været anvendt i vid udstrækning som uofficiel standard, og van der Kooij udgav i 1995 en detaljeret gennemgang af metoden /van der Kooij et al., 1995/. En variation af metoden er optaget i /Standard Methods, 1998/, men denne udgave skønnes ikke at være hensigtsmæssig i projektets sammenhæng, da den foreslåede arbejdsgang kan introducere større usikkerhed ved den enkelte bestemmelse, idet der anvendes serier af mindre testbeholdere i stedet for en enkelt testbeholder.



Figur 2: Principskitse af AOC-metodens udførelse, jævnfør nedenstående tekst.

Metoden er et bio-assay, hvor en vandprøves AOC-værdi bestemmes ud fra det antal bakterier, der kan vokse op på de organiske kulstofforbindelser i prøven. Vandprøven tappes i en kulstoffri testflaske, og prøvens naturlige bakteriepopulation inaktiveres ved pasteurisering. Prøven podes efterfølgende med to bakteriestammer, *Pseudomonas fluorescens*, stamme P17 og *Aquaspirillum*, stamme NOX (tidligere kaldt Spirillum, NOX), der tilsammen kan omsætte langt størstedelen af de organiske kulstofforbindelser i drikkevand /van der Kooij et al., 1995/. Prøven inkuberes i mørke ved 15°C, og bakterieantallet følges over tid ved at bestemme kimtallet på R<sub>2</sub>A, et lavsubstrat medie specielt egnet til bestemmelser i næringsfattige miljøer (sammensætningen af R<sub>2</sub>A-agar er angivet i Bilag B). Vækstkurvernes maksimale bakterieantal omsættes til prøvens AOC-værdi udtrykt i µg acetat-C ækvivalenter/L ved brug af udbyttekonstanter for P17 og NOX på acetat. Udbyttekonstanterne for acetat-koncentrationer på 5-250 µg acetat-C/L er 4,1\*10<sup>6</sup> CFU/µg acetat-C for P17 og 1,2\*10<sup>7</sup> CFU/µg acetat-C for NOX /van der Kooij et al., 1995/.

I Bilag C er AOC-metoden gennemgået detaljeret i den udgave, der dannede baggrund for projektarbejdet. I projektet blev der anvendt stammer af P17 og NOX tilsendt fra van der Kooij, KIWA.

### 3.2 Metodeovervejelser

Kontakten mellem materiale og vandfase kunne principielt etableres på to måder. Vandet kunne henstå i givne rørlængder, og derefter blive overført til testflaskerne til AOC-bestemmelse, hvilket ville modsvare virkelige forhold. Alternativt kunne rørstykker henstå i testvand i testflaskerne, hvori AOC-bestemmelsen ville blive udført. Denne fremgangsmåde blev benyttet, da det derved også ville være muligt at anvende testmetoden til at undersøge andre vandforsyningsselementer end rør, såsom fittings. Dette begrænser dog samtidig metoden til kun at kunne omfatte rør af samme materiale på inder- og ydreside.

Andre væsentlige testforhold var:

- Hvilket vand skulle anvendes som testvand.
- Hvilket forhold imellem materialeoverflade og vandvolumen (S/V-forhold) skulle materialerne undersøges ved.
- Hvordan skulle materialestykkerne forbehandles (renses) før test.
- Hvilket materiale kunne anvendes som ballastmateriale.
- Ved hvilken temperatur skulle materialerne testes.
- Skulle ekstraktionen af materialet udføres med bakterier og materiale til stede i testflaskerne samtidig, eller skulle AOC-værdien bestemmes på et vandigt ekstrakt af materialet.
- Hvor lang ekstraktionsperiode skulle der anvendes - og skulle ekstraktionen foregå med omrystning.

#### 3.2.1 Testvand

Da de polymere materialer skulle undersøges ved forhold gældende for dansk vandforsyning, skulle testvandet have samme egenskaber som dansk drikkevand. Det enkleste ville således være at anvende frisk produceret drikkevand med et lavt AOC-indhold.

	pH	Lednings- evne	KMnO <sub>4</sub>	Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Hårdhe- d	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
Enhed		mS/m	mg/L	mg/L	mg/L	°dH	mg/L	mg/L
Værdi	7,65	82,0	3,0	119	13	19,6	23	3,8
	CO <sub>2</sub>	Indamp- ningsrest	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Fe	Mn	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Enhed	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Værdi	<2	470	<0,05	<0,01	<0,005	320	64	49
	P	Farvetal	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	O <sub>2</sub>	Ni	NVOC
Enhed	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	µg/L	mg/L
Værdi	<0,02	4	2,1	<0,01	0,32	7,6	<3	1,70

Tabel 4: Parametre for vand fra Lyngby Vandværk. /Lyngby-Tårnbæk Kommune, 2000/.

Der blev i projektet anvendt vand fra Lyngby Vandværk som testvand, idet IMT har en del måle-erfaringer med dette vand. Selvom Lyngby Vandværk pumper fra flere forskellige borer, har det færdigbehandlede vand generelt lave AOC-værdier i størrelsesordenen 2-10 µg acetat-C/L, hvilket ville sikre lave blindværdier under udførelse af test (parametre for vand fra Lyngby Vandværk er angivet i Tabel 4). Der blev udført en enkelt undersøgelse med tilsætning af phosphor til testvandet, men det blev ikke skønnet nødvendigt at tilsætte næringssalte til testvandet.

### 3.2.2 Mængde af testmateriale

Materialet, der skulle undersøges, blev udskåret i passende stykker (teststykker), som blev tilsat testflaskerne. For at opnå en størrelse på teststykkerne, der dels var til at arbejde med, og dels ikke ville kræve for store mængder materiale, blev der indledningsvis valgt et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup>. Dette svarer til S/V-forholdet i et fyldt rør med en indre rørdiameter på 8 cm. Med et vandvolumen på 200 mL blev der anvendt et totalt overfladeareal (inder- og yderside samt skæreflader) af testmaterialet på 100 cm<sup>2</sup>. Under det eksperimentelle arbejde blev et bredt spektrum af S/V-forhold afprøvet, hvor fra det blev besluttet af fastholde S/V-forholdet på 0,5 cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.3 Forbehandling af testmateriale

Proceduren til for-vaskning af teststykkerne tog udgangspunkt i migrationsstandardens /DS/EN 852-1, 1997/ med den modifikation, at teststykker blev for-vasket i flasker, mens der i standarden for-vaskes ved opfyldning af rørlængder. Teststykkerne henstod således et døgn i postevand og blev efterfølgende skyllet i postevand 1 time.

For at kunne udføre AOC-bestemmelsen med renkulturer måtte den naturlige population på teststykkerne inaktiveres inden testen. Efter skylningen blev teststykkerne derfor desinficeret ved pasteurisering i postevand ved et S/V-forhold svarende til testsituationen (udføres i samme flasker som skylningen med låget skruet helt til). Efter afkøling blev teststykkerne taget op, overhældt med pasteuriseret testvand for at skylle vand fra pasteuriseringen af, og derefter overført til testflaskerne med pasteuriseret testvand.

Under det eksperimentelle arbejde blev der til sammenligning afprøvet kloring som desinfektionsmetode. Ud fra de opnåede resultater og af praktiske hensyn blev pasteurisering fastholdt som desinfektionsmetode.

### 3.2.4 Ballastmateriale

Teststykker af materialer med mindre massefylde end vand blev påsat en ballast for at holde teststykkerne under vandoverfladen. I de indledende undersøgelser blev det forsøgt at anvende glaskugler som ballastmateriale, men disse blev senere erstattet af net af rustfrit stål, som blev skåret til i passende stykker. Ballastmaterialet blev påsat hver enkelt teststykke inden forbehandlingen af teststykkerne.

### 3.2.5 Ekstraktionsmetode

Indledningsvis blev materialerne ekstraheret ved 10°C svarende til en gennemsnitlige temperatur i ledningsnettet. Undervejs i udviklingsarbejdet blev testtemperaturen hævet til 20±2°C, dels for at modsvare andre migrationstest udført af Miljøstyrelsen, og dels for at repræsentere et "worst case" scenario svarende til temperaturen, der i visse situationer kan opnås i dele af distributionsnettet.

Ekstraktionstiden blev indledningsvis sat til 20 døgn, som en absolut maksimal opholdstid i ledningsnettet. I det eksperimentelle arbejde blev der afprøvet flere forskellige ekstraktionstider, hvilket førte til en ekstraktionstid på 15 døgn.

Ekstraktionen af materialer kunne udføres med eller uden tilstedeværelsen af aktive bakterier. I de indledende undersøgelser blev begge ekstraktionsformer afprøvet både med en naturlig population samt med P17 og NOX. Ud fra de udførte undersøgelser blev det besluttet at udføre ekstraktionen uden tilstedeværelser af aktive bakterier, med efterfølgende AOC-bestemmelse på ekstraktet. Undersøgelserne indikerede, at kun P17 kunne omsætte de stoffer, der blev afgivet fra materialerne, hvorfor AOC-bestemmelser på ekstrakter følgelig blev udført med P17 som eneste testbakterie.

## 3.3 Testmetode

De eksperimentelle undersøgelser ledte til nedenstående procedure. Hvor intet andet er anført er de eksperimentelle undersøgelser udført efter samme fremgangsmåde. Metoden kan opsummeres til bestående af to trin:

1. Ekstraktion af materiale uden tilstedeværelse af bakterier
2. AOC-bestemmelse på det opnåede ekstrakt med P17

### 3.3.1 Arbejdsgang

Alt arbejde med åbne prøver og podekulturer foregår i sterilbænk.

Testvandet afhentes direkte på vandværket dagen før eller på selve dagen, hvor testen startes. Testvandet udvejes til 200±2 mL i 250 mL 'red cap'-flasker (PYREX) med 'red cap'-låg med teflonindlæg (SCHOTT DURAN). Vandets naturlige bakteriepopulation inaktiveres ved pasteurisering ved 60°C (med flaskernes låg skruet helt til):

- Hurtig opvarmning til 60°C i 90°C vandbad (temperatur følges i referenceflaske).

- Henstand 45 minutter i 60°C varmeovn.  
Testvandet afkøles og opbevares på køl indtil påbegyndelse af test.

I undersøgelsen indgår kun materiale uden skrift, som ikke har været påsat tape eller lignende, og fra produktionssted til test tages der de nødvendige forholdsregler til at sikre at materialet ikke kontamineres med eksternt organisk stof. Testmaterialer tilsendes direkte fra producenterne indpakket i stanniol eller pap, og på produktionsstedet er rør-emnerne håndteret under brug af engangshandsker. Testmaterialer tilskæres på et underlag af stanniol med rensede værktøj reserveret til arbejdet, idet der bæres vinyl-engangshandsker under arbejdet.

Materialet udskæres (med rørsåer, skalpel eller nedstryger) i teststykker med et totalt overfladeareal på 100 cm<sup>2</sup>, svarende til et S/V-forhold i testsituationen på 0,5 cm<sup>-1</sup>. Hvert enkelt teststykke påsættes en ballast af rustfrit stålnet og forbehandles i flasker ved følgende procedure:

For-vask:

- Henstand 24±1h i postevand ved stuetemperatur i mørke, ved et S/V-forhold svarende til testsituationen.
- Skylling i rindende postevand (1 L/min) i 60±10 min i de enkelte flasker.

Den naturlige population på teststykkerne inaktiveres ved pasteurisering i postevand ved 60°C og et S/V-forhold svarende til testsituationen (med flaskernes låg skruet helt til):

- Opvarmning til 60°C i 60°C vandbad (temperatur følges i referenceflaske)
- Henstand 45 minutter i 60°C varmeovn.

(Flere sæt teststykker af samme materiale kan forbehandles i samme flaske, så længe det korrekte S/V-forhold fastholdes). Efter afkøling tages teststykkerne op med en pincet, skylles ved overhældning med pasteuriseret testvand og overføres til testflaskerne med pasteuriseret testvand. Flaskerne indpakkes i stanniol for at hindre algevækst og fotokemisk nedbrydning.

Alle prøver opstilles i triplikate med tilhørende blindprøver med pasteuriseret testvand og ballastmateriale.

Teststykkerne ekstraheres i 15 døgn ved 20±2°C under horisontal omrystning (95 omdrejninger/min - hvilket ikke medfører kontakt imellem låg og vandfase). Efter endt ekstraktion tages teststykkerne op med en pincet, og ekstrakter og blindprøver podes med P17 til en startkoncentration på 200-500 CFU/mL. Ekstrakter og blindprøver inkuberes ved 15°C, hvorunder bakterieantallet følges ved bestemmelse af kimtal dag 0, 3, 4, 5, 7, 10, 15. Såfremt vækstkurverne ikke stagnerer eller er faldet dag 15 bestemmes kimtal endvidere dag 20 og eventuelt dag 25.

Kimtal bestemmes ved overfladeudsæd på R<sub>2</sub>A-agar, hvor pippeteringer foretages med finpipetter med engangspidser af polypropylen. Inden prøveudtagning fra en flaske føres denne i kraftige horisontale cirkelbevægelser for at homogenisere prøven. Når fortynding af en prøve er

---

<sup>1</sup>Opvarmningen af vandfasen har kun sekundær betydning i forbindelse med pasteurisering af teststykkerne. Vandbadet blev derfor holdt på 60°C i stedet for 90°C, som ved ordinær AOC-bestemmelse. Dette gav en længere opvarmningstid for vandfasen i flaskerne, men det sikrede, at teststykkerne ikke blev udsat for temperature højere end 60°C.

nødvendig, fremstilles en ti-fold fortyndingsrække ved at overføre 100  $\mu\text{L}$  prøve til eppendorf-rør med 900  $\mu\text{L}$  autoklaveret postevand. Der omblandes ved vortex-mixning, og herfra fremstilles den videre fortyndingsrække på samme vis, indtil de ønskede fortyndinger er opnået. Skal den ufortyndede prøve udplades, udtages der i stedet 300  $\mu\text{L}$  prøve til tomt eppendorf-rør, hvorfra udpladning fortages og den videre fortyndingsrække fremstilles.

Fra tre fortyndinger udplades 50  $\mu\text{L}$  i triplikater, ialt 9 plader. Kolonier optælles efter 2-3 døgns inkubation ved 25°C, idet plader med over 200 kolonier generelt ikke optælles.

#### 3.3.1.1 Rensningsprocedurer for udstyr

De anvendte flasker, låg og finnpipetter anvendes udelukkende til undersøgelse af AOC-afgivelse for at hindre, at anden tidligere anvendelse medfører afgivelse af organisk stof eller stof, der hæmmer bakterievækst.

For at fjerne organisk kulstof rengøres testflasker og låg inden brug ved følgende procedure:

- Skylls med MilliQ-vand
  - Henstand i 10% salpetersyre i minimum et døgn
  - Skylls 6 gange med MilliQ-vand
  - Mundingen dækkes med stanniol
  - Glasflasker glødes ved 220°C i 5 timer - 'red cap'-låg ved 180°C i 6 timer
- Pincetter og værktøj til udskæring af materiale renses for organisk kulstof ved glødning i gasflamme og afkøles inden brug, mens ballastmaterialet glødes ved 220°C i minimum 5 timer.

Til desinficering af arbejdsområde og drigalskispapirer må der ikke anvendes sprit, da dette vil kontaminere prøverne med organisk stof og resultere i forhøjede P17 koncentrationer. Arbejdsområde aftørres med en 0,05% CTMAK-opløsning (cetyltrimethylammoniumchlorid - giver ikke anledning til forhøjede P17 eller NOX værdier), og stål-drigalskispapirer glødes i gasflamme og afkøles inden brug.

Pipettespidser renses ikke specielt før brug, men tages direkte fra leveringsposer. Spidser, der skal i direkte kontakt med prøve, pakkes under brug af vinyl-engangshandsker for at begrænse overførelse af organisk materiale. Eppendorf-rør og pipettespidser autoklaveres, og tørres derefter ved 80°C.

#### 3.3.1.2 Podekulturer

Separate podekulturer af P17 og NOX fremstilles ved opdyrkning af bakterierne ved 15°C i næringssaltsmedie med 1 mg/L acetat ved 15°C /van der Kooij et al., 1995/. Bakteriernes vækst følges ved overfladeudsæd på R<sub>2</sub>A-agar, indtil et maksimalt bakterieantal er opnået. Herefter opbevares kulturene i køleskab, hvor de har en holdbarhed på omkring et halvt år.

### 3.3.2 Databehandling

Kolonital fra alle talte fortyndinger vurderes som et samlet datasæt inden videre behandling. Afvigere identificeres på et 95% signifikantsniveau ved nedenstående procedure:

- For hver fortyndingsrække beregnes for hver enkelt fortynding et forventet kolonital ( $e_i$ ) ud fra den totale udstrøgne prøvemængde og det totale antal talte kolonier i denne prøvemængde:



$$e_i = \frac{C}{W} * W_i$$

C:  $\sum C_i$

W:  $\sum W_i$

$C_i$ : antal kolonier fra enkel udstrygning i fortyndingsrækken

$W_i$ : volumenet udstrøget

- Ud fra forventningsværdien beregnes den øvre og nedre grænse i et 95% konfidensinterval.
- Afvigere identificeres ved sammenligning med konfidensintervallet. Der ses bort fra udstrygninger med under 6 kolonier, da poissonfordelingen kun kan antages at være gældende ved kolonital højere end 5.

Såfremt datasættets afvigere skyldes den naturlige variation på bestemmelsen, bør metoden identificere omkring 5% af kolonitalene som afvigere (2,5-7,5% accepteres). Afvigere bør generelt ikke kasseres, men vurderes i hvert enkelt tilfælde, da der ikke kan ses bort fra den naturlige variation. Metoden anvendes således til at vurdere datasættets kvalitet inden videre beregning. /Boe-Hansen, 1998a/

For hver enkelt bestemmelse beregnes kimtallet som et vægtet gennemsnit ud fra den totale udstrøgne prøvemængde og det totale antal talte kolonier i prøvemængden. Den observerede spredning (error of mean, E.O.M.) på kimtallet følger en Poissonfordeling og vil følgelig være  $\sqrt{C}$ . Kimtallet bestemmes således som:

$$Y = \frac{\sum C_i \pm \sqrt{\sum C_i}}{\sum W_i} = \frac{C \pm \sqrt{C}}{W} \quad \text{/Niemelä, 1983/}$$

E.O.M.-værdien angiver således ikke hvor stor spredning, der er imellem replika, men angiver en præcision af bestemmelsen, idet et højere antal talte kolonier giver en større præcision på bestemmelsen.

De beregnede kimal omsættes til AOC-værdier ved brug af udbyttekonstanterne angivet i afsnit 3.1

### 3.3.3 Gennemsnitlig vækstkurve

Ud fra de beregnede kimal optegnes vækstkurver for triplicate prøver. Kurverne sammenlignes for at vurdere kvaliteten af de opnåede ekstrakter. Et stærkt afvigende vækstkurveforløb i forhold til de to øvrige prøver indikerer afvigende forhold, som gør at ekstraktet ikke repræsenterer afgivelsen fra materialet. Ligeledes vil en stærkt afvigende høj værdi indikere en forurening med eksternt kulstof. Prøver med sådanne stærkt afvigende vækstkurveforløb ses der bort fra. Ligeledes ses der bort fra en prøve, hvis denne er kontamineret med uønskede bakterier.

Ved beregning af det gennemsnitlige vækstkurveforløb ud fra triplicate (duplikate) prøver opnås den bedste bestemmelse af den gennemsnitlige kurves beliggenhed ved at gå tilbage til de oprindelige kolonitællinger. De triplicate prøver betragtes som fortyndingsrækker, og det vægtede gennemsnit bestemmes over triplicaterne:

$$Y = \frac{\sum C_{ii} \pm \sqrt{\sum C_{ii}}}{\sum W_{ii}}$$

$C_{ii}$ : antal kolonier fra enkel udstrygning blandt triplikater

$W_{ii}$ : volumen udstrøget

Når E.O.M. således beregnes på det samlede datamateriale, medregnes ikke variationen imellem de triplikate prøver.

Der er i dette projekts arbejde ikke fastlagt variationen imellem vækstkurver, da fastlæggelsen af gennemsnitlige kimtal har været prioriteret højest, og der kun har været 2-3 vækstkurver.

Hvis bestemmelsen af variationen imellem et større antal vækstkurver i andre tilfælde prioriteres højere end bestemmelsen af det gennemsnitlige kimtal, kan den gennemsnitlige vækstkurve beliggenhed bestemmes ud fra en logaritmisk normalfordeling:

På logaritmisk transformerede kimtal beregnes for hvert sæt triplikate prøver et (aritmetisk) gennemsnit,  $\mu$ , og en spredning,  $\sigma$ . Her ud fra bestemmes det gennemsnitlige kimtal ved:

$$Y = 10^{\mu + \frac{1}{2}\sigma^2}$$

Det tilhørende 95% konfidensinterval vil være skævt fordelt og bestemmes ud fra t-fordelingen som:

$$\text{øvre: } 10^{\left(\mu - \frac{t(n)_{0,025} * \sigma}{\sqrt{n}}\right)}$$

$$\text{nedre: } 10^{\left(\mu - \frac{t(n)_{0,975} * \sigma}{\sqrt{n}}\right)}$$

- hvor n er antallet af replikater og  $t(3)_{0,025} = -4,303$  og  $t(2)_{0,025} = -12,706$  /Kotz et al., 1982/.

## 4 Ekstraktionsmetoder

Første trin i at fastlægge en ekstraktionsmetode var at afgøre om ekstraktionen af materialet skulle forløbe med eller uden tilstedeværelsen af testbakterierne. En mulighed var at ekstraheres materialet uden tilstedeværelse af testbakterier, med en efterfølgende ordinær AOC-bestemmelse på ekstraktet. En anden mulighed, som i højere grad ville simulere forholdene i distributionsnet, ville være at ekstrahere materialet med testbakterierne tilstede, hvorved AOC-værdien bestemmes samtidigt med ekstraktionen. En tredje mulighed ville være at ekstrahere materialet sammen med en naturlig drikkevandspopulation, hvilket ville give en endnu bedre simulering af forholdene i et distributionsnet. Dette ville dog ikke resultere i en konkret AOC-værdi, men det maksimalt opnåede bakterieantal ville i stedet kunne anvendes som mål for eftervækstpotentialet. For at afgøre hvilken type ekstraktion af materialet der var mest hensigtsmæssig, blev følgende tre ekstraktionsmetoder afprøvet:

- Ekstraktion uden aktive bakterier (med efterfølgende AOC-bestemmelse på ekstraktet)
- Ekstraktion med P17 og NOX (samtidig AOC-bestemmelse)
- Ekstraktion med en naturlig population (som kontrol blev AOC bestemt efterfølgende)

### 4.1 Forsøgsgang

De tre ekstraktionsmetoder blev afprøvet i serier opdelt i to faser på hver 20 døgn. Teststykker blev ekstraheret fra dag 0 til dag 20, hvor stoffer fra materialerne kunne afgives til vandfasen. Dag 20 blev teststykkerne taget op, hvorved der fra dag 20 til dag 40 kunne måles AOC på ekstrakterne uden teststykkernes tilstedeværelse.

Teststykker blev ekstraheret ved 10°C, mens ekstrakterne blev inkuberet ved 15°C. Testvandet blev i dette forsøg tilsat 10 µg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-P/L inden brug for at hindre, at væksten skulle blive begrænset som følge af phosphormangel.

I Figur 3 er angivet en principskitse af undersøgelsen af ekstraktionsmetoder.

#### 4.1.1 Ekstraktion uden aktive bakterier

Forbehandlede teststykker med ballastmateriale (pasteuriseret i 30 minutter) blev ekstraheret i pasteuriseret testvand uden omrystning i mørke ved 10°C i 20 døgn. Dag 20 blev det ved en pladespredning kontrolleret, at der ikke var aktive bakterier tilstede i vandfasen. Derefter blev testmaterialet taget op, og ekstrakterne blev podet med P17 og NOX til AOC-bestemmelse. Ekstrakterne blev inkuberet i mørke ved 15°C i yderligere 20 døgn, hvor kimtallet blev bestemt på R<sub>2</sub>A-agar dag 20, 25, 27, 30, 35, 40.

#### 4.1.2 Ekstraktion med P17 og NOX

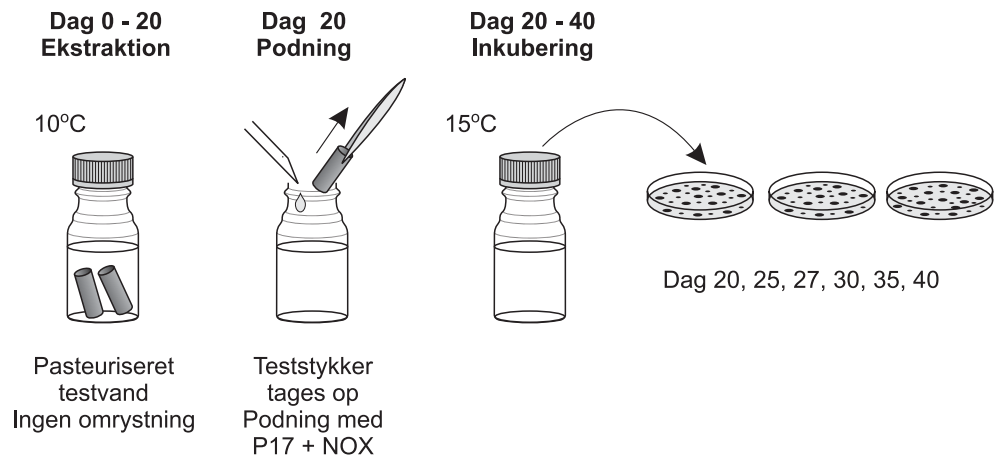
Forbehandlede teststykker med ballastmateriale (pasteuriseret i 30 minutter) blev ekstraheret i pasteuriseret testvand, der dag 0 blev podet med P17 og NOX, så ekstraktionen forløb samtidig med væksten af P17 og NOX. Den

kombinerede ekstraktion og AOC-bestemmelse forløb uden omrystning i mørke ved 10°C i 20 døgn, hvor kimtallet blev bestemt på R<sub>2</sub>A-agar dag 0, 5, 7, 10, 15, 20.

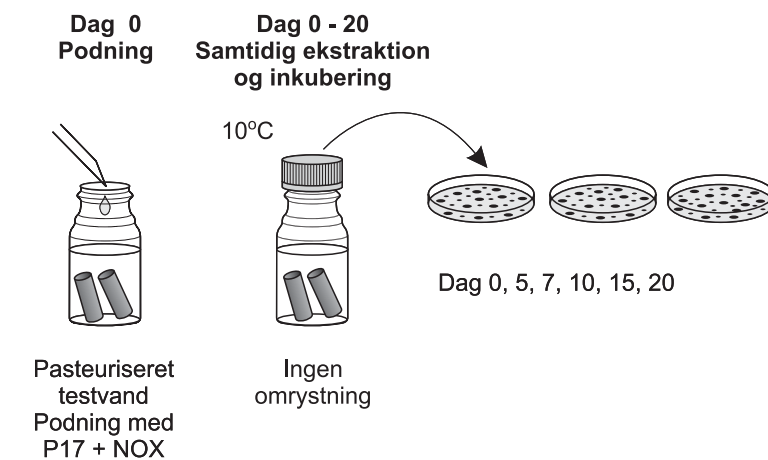
#### **4.1.3 Ekstraktion med en naturlig population**

Forbehandlede teststykker med ballastmateriale (pasteuriseret i 30 minutter) blev ekstraheret i pasteuriseret testvand, der dag 0 blev podet med testvand i forholdet 9:1 (180 mL pasteuriseret testvand og 20 mL testvand). Ekstraktionen forløb efterfølgende ved 10°C i 20 døgn, hvorunder kimtallet for den naturlige population bestemt på R<sub>2</sub>A-agar (14 døgn ved 25°C) dag 0, 5, 7, 10, 15, 20. Dag 20 blev testmaterialet taget op. For at undersøge om der var tilgængeligt AOC tilstede efter denne inkubering, blev ekstrakterne pasteuriseret som ved en vanlig AOC-bestemmelse, podet med P17 og NOX og derefter inkuberet i mørke ved 15°C i endnu 20 døgn, hvor kimtallet blev bestemt på R<sub>2</sub>A-agar dag 20, 25, 27, 30, 35, 40.

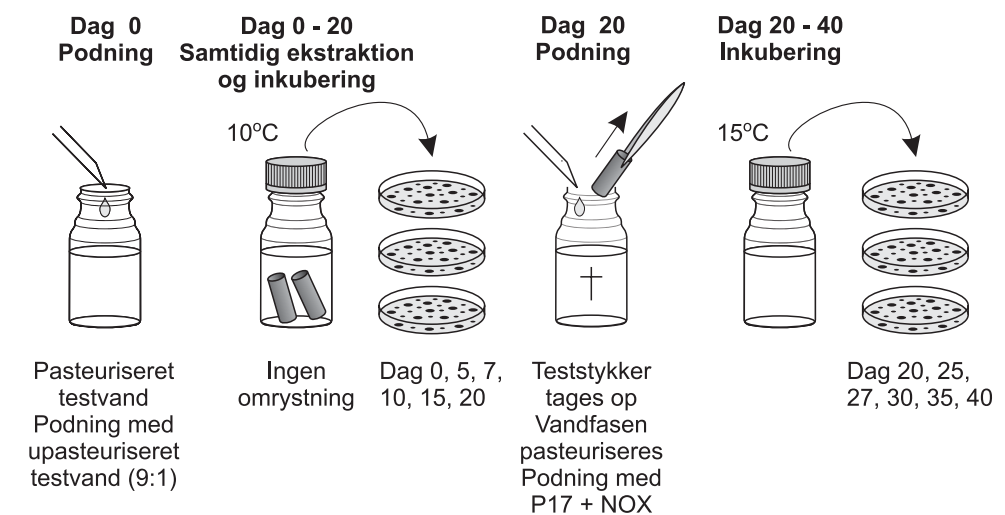
### Ekstraktion uden aktive bakterier:



### Ekstraktion med P17 og NOX:



### Ekstraktion med en naturlig population:



Figur 3: Principskitse af undersøgelsen af ekstraktionsmetoder: Ekstraktion uden aktive bakterier; Ekstraktion med P17 og NOX; Ekstraktion med en naturlig population. Jævnfør ovenstående tekst.

Ekstraktionsmetoderne blev undersøgt med to materiale-typer: hvidt PEX-rør og blåt PEM<sub>(1)</sub>-rør. I hvert PEX-rørstykke blev en glaskugle (renset på samme måde som testflaskerne) sat i spænd i den ene ende som ballastmateriale, men

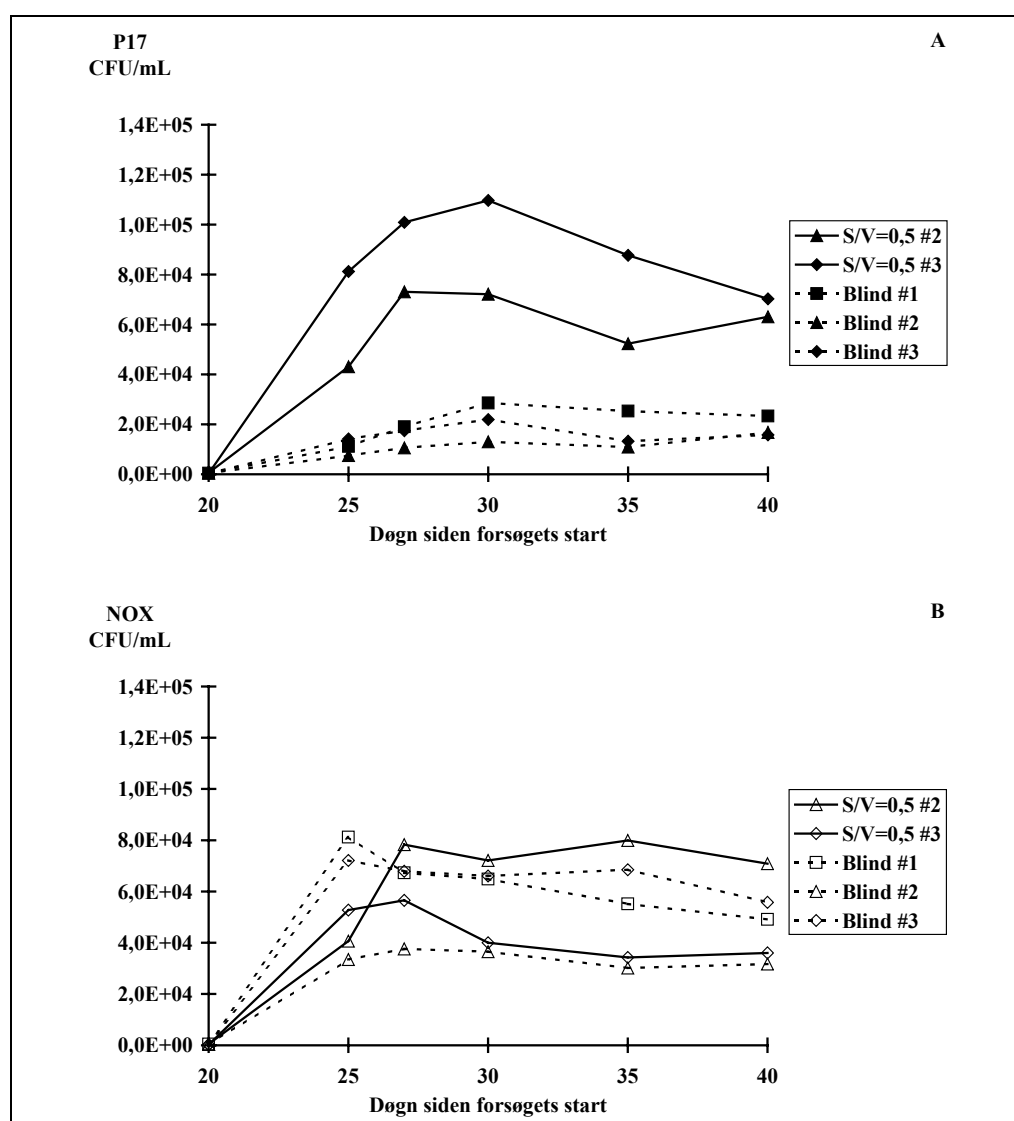
enkelte af rørstykkerne blev så påvirket af pasteuriseringen, at spændet på glaskuglerne ikke kunne holdes. Dette blev dog skønnet ikke at have den store indflydelse på forsøget, da mindre end 2% af de pågældende rørs totale overflade ikke var vanddækket. Til PEM-rørstykkerne blev der anvendt net af rustfrit stål som ballastmateriale.

## 4.2 Resultater

Bakteriekoncentrationer og AOC-værdier er angivet i Bilag H.

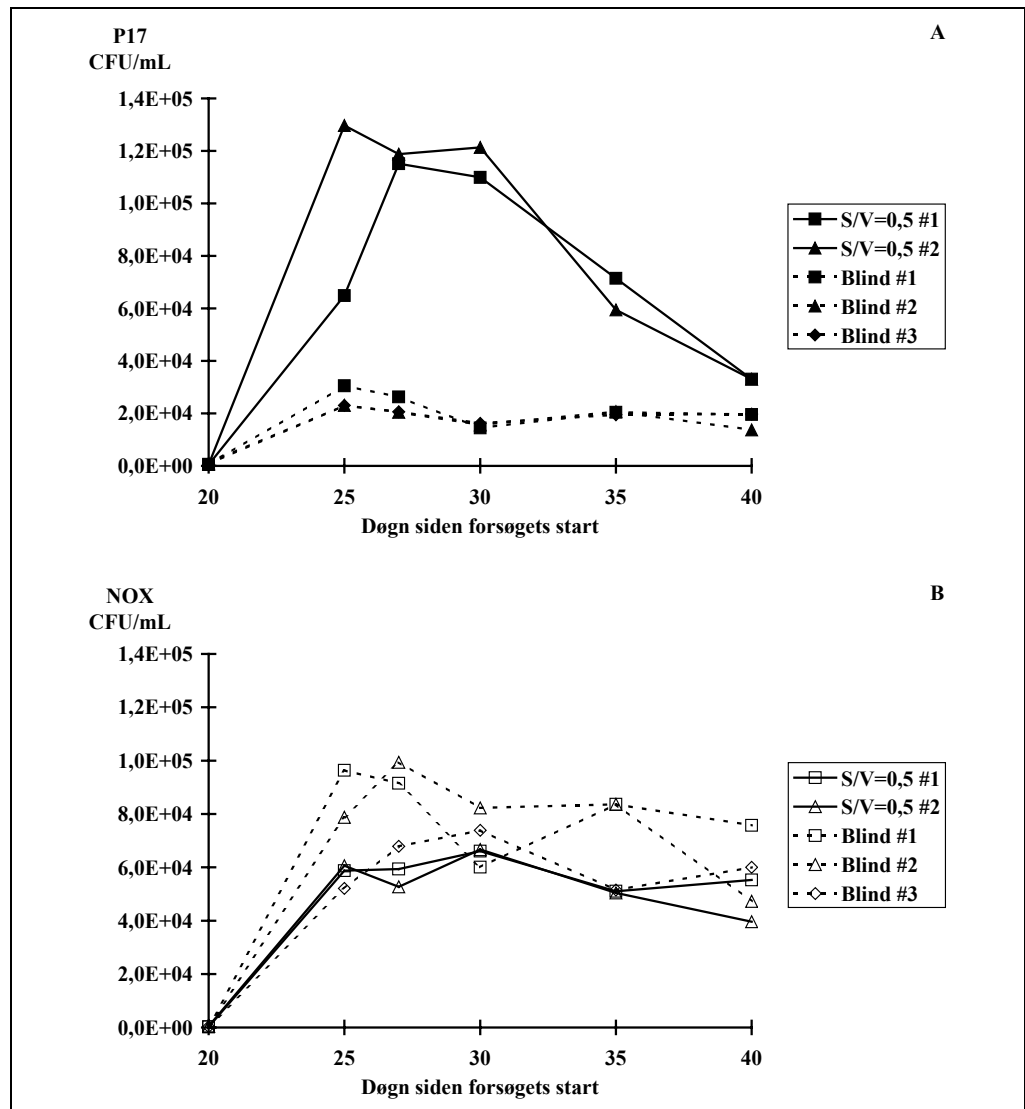
### 4.2.1 Ekstraktion uden aktive bakterier

I ekstrakterne af PEX og blåt PEM<sub>(1)</sub> fremstillet uden aktive bakterier nåede vækstkurverne for P17 og NOX et maksimum, hvorefter de stagnerede eller faldt inden for 20 døgn (Figur 4 og Figur 5). Koncentrationerne af P17 var højere i ekstrakterne end i blindprøverne, mens der ikke var den store forskel på koncentrationerne af NOX imellem ekstrakter og blindprøver.



Figur 4: Vækstkurver for P17 (A) og NOX (B) i ekstrakter af PEX materiale og i tilhørende blindprøver. Ekstraktionen forløb over 20 døgn ved 10°C uden omrystning. Efter material et var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og NOX og inkuberet ved 15°C.

Ved beregning af gennemsnitlige AOC-værdier (Tabel 5) var  $AOC_{Total}$  for begge materialer  $19 \mu\text{g}$  acetat-C/L, men for PEM materialet var  $AOC_{NOX}$  lavere i ekstrakterne end i de tilhørende blindprøver. Dette kan forklares ved den kraftige vækst af P17 i ekstrakterne. De mange P17 har omsat stofferne, som P17 og NOX konkurrerer om, og har derved ikke levnet substrat til de færre NOX. Dette har ikke været tilfælde med blindprøverne, hvor P17 og NOX har haft mere ligeværdige konkurrenceforhold.



Figur 5: Vækstkurver for P17 (A) og NOX (B) i ekstrakter af blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale og tilhørende blindprøver. Ekstraktionen foretoges over 20 døgn ved 10°C uden omrystning. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og NOX og inkuberet ved 15°C.

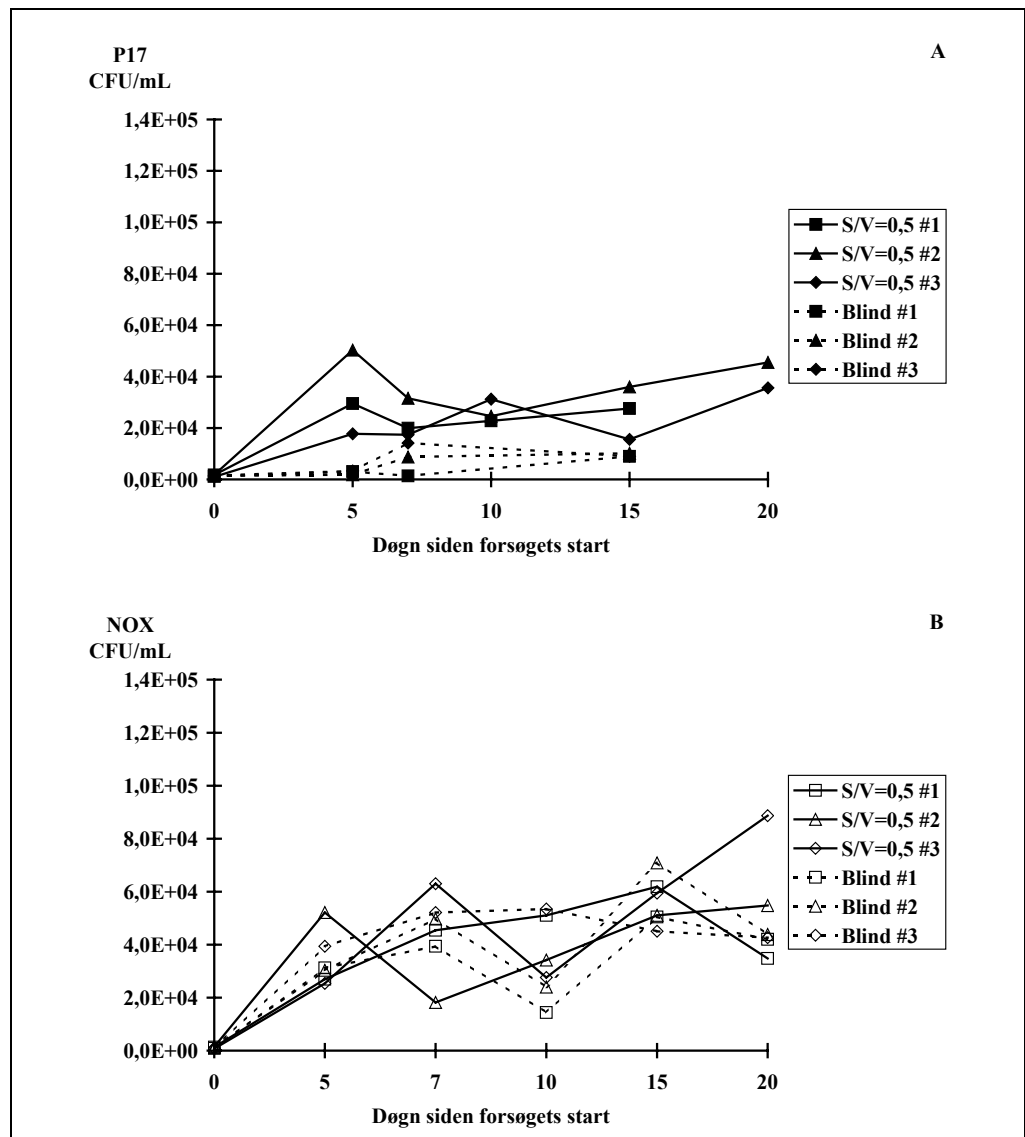
Materiale	[µg acetat-C/L]					
	+ blindværdi			- blindværdi		
	AOC <sub>P17</sub>	AOC <sub>NOX</sub>	AOC <sub>Total</sub>	AOC <sub>P17</sub>	AOC <sub>NOX</sub>	AOC <sub>Total</sub>
PEX	22	6	28	17	2	19
Blind	5	4	9			
Blå PEM <sub>(1)</sub>	29	4	32	22	-3	19
Blind	6	7	13			

Tabel 5: Gennemsnitlige AOC-værdier ved AOC-bestemmelse på ekstrakt: Ekstraktionen forløb over 20 døgn ved 10°C uden omrystning og ved et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup>. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og NOX og inkuberet ved 15°C.

#### 4.2.2 Ekstraktion med P17 og NOX

I ekstrakter af PEX og blå PEM<sub>(1)</sub> fremstillet med samtidig AOC-bestemmelse stagnerede eller faldt vækstkurverne for P17 og NOX ikke inden for den 20 døgn periode (Figur 6 og Figur 7). Der blev opnået en smule højere P17 koncentrationer i ekstrakterne end i blindprøverne, hvilket ikke gjorde sig gældende for NOX koncentrationerne.





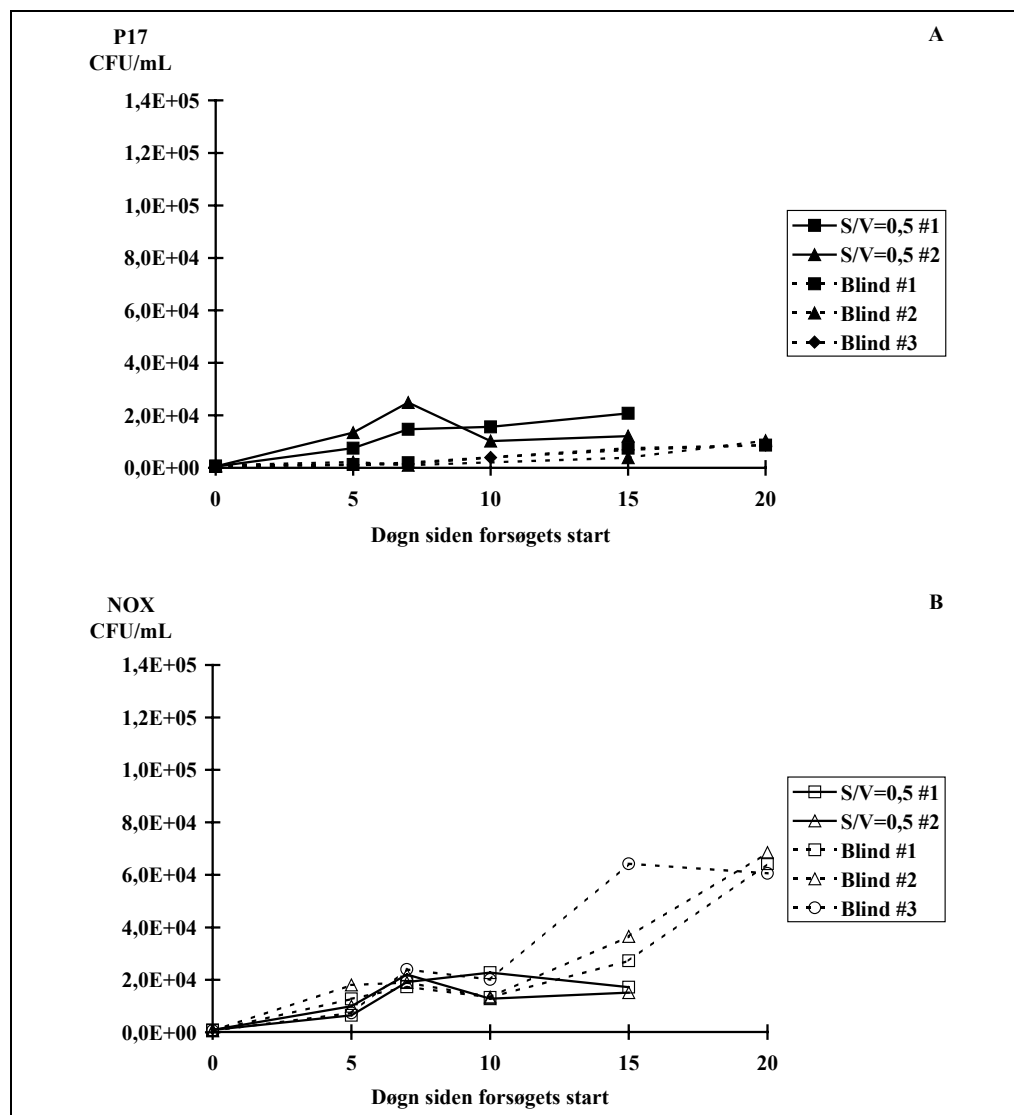
Figur 6: Vækstkurver for P17 (A) og NOX (B) i ekstrakter under ekstraktion af PEX materiale og i tilhørende blindprøver. Ekstraktionen forløb under tilstedeværelse af P17 og NOX over 20 døgn ved 10°C uden omrystning.

Materiale	[µg acetat-C/L]					
	+ blindværdi			- blindværdi		
	AOC <sub>P17</sub>	AOC <sub>NOX</sub>	AOC <sub>Total</sub>	AOC <sub>P17</sub>	AOC <sub>NOX</sub>	AOC <sub>Total</sub>
PEX	6	5	11	4	0	4
Blind	2	5	7			
Blå PEM <sub>(1)</sub>	5	2	7	4	-2	2
Blind	1	4	5			

Tabel 6: Gennemsnitlige AOC-værdier ved samtidig ekstraktion og AOC-bestemmelse: Ekstraktionen forløb under tilstedeværelse af P17 og NOX over 20 døgn ved 10°C uden omrystning og ved et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup>.

Ved beregning af maksimale gennemsnitlige AOC-værdier (Tabel 6) var AOC<sub>Total</sub> for PEX materialet 4 µg acetat-C/L og 2 µg acetat-C/L for blåt PEM<sub>(1)</sub>, hvilket kun var 10-20% af niveauet fundet ved ekstraktion uden aktive bakterier (Tabel 5). Bestemmelsen af AOC-værdier i ekstrakter fremstillet uden aktive bakterier forløb som en normal AOC-bestemmelse ved 15°C,

mens AOC-bestemmelsen med samtidig ekstraktion blev udført ved 10°C. Vækstforholdene for P17 og NOX var således forskellig i de to undersøgelser, og da væksthastigheden af de to bakteriestammer formentlig er lavere ved 10°C end ved 15°C, er det muligt, at bakterierne ikke nåede vækstmaksimum inden for testperiodens 20 døgn. Det var således nok i højere grad den lavere væksttemperatur end ekstraktionsmetoden, der var årsag til de lavere AOC-værdier.



Figur 7: Vækstkurver for P17 (A) og NOX (B) i ekstrakter under ekstraktion af blå PEM<sub>(1)</sub> materiale og i tilhørende blindprøver. Ekstraktionen forløb under tilstedeværelse af P17 og NOX over 20 døgn ved 10°C uden omrystning.

#### 4.2.3 Ekstraktion med en naturlig population

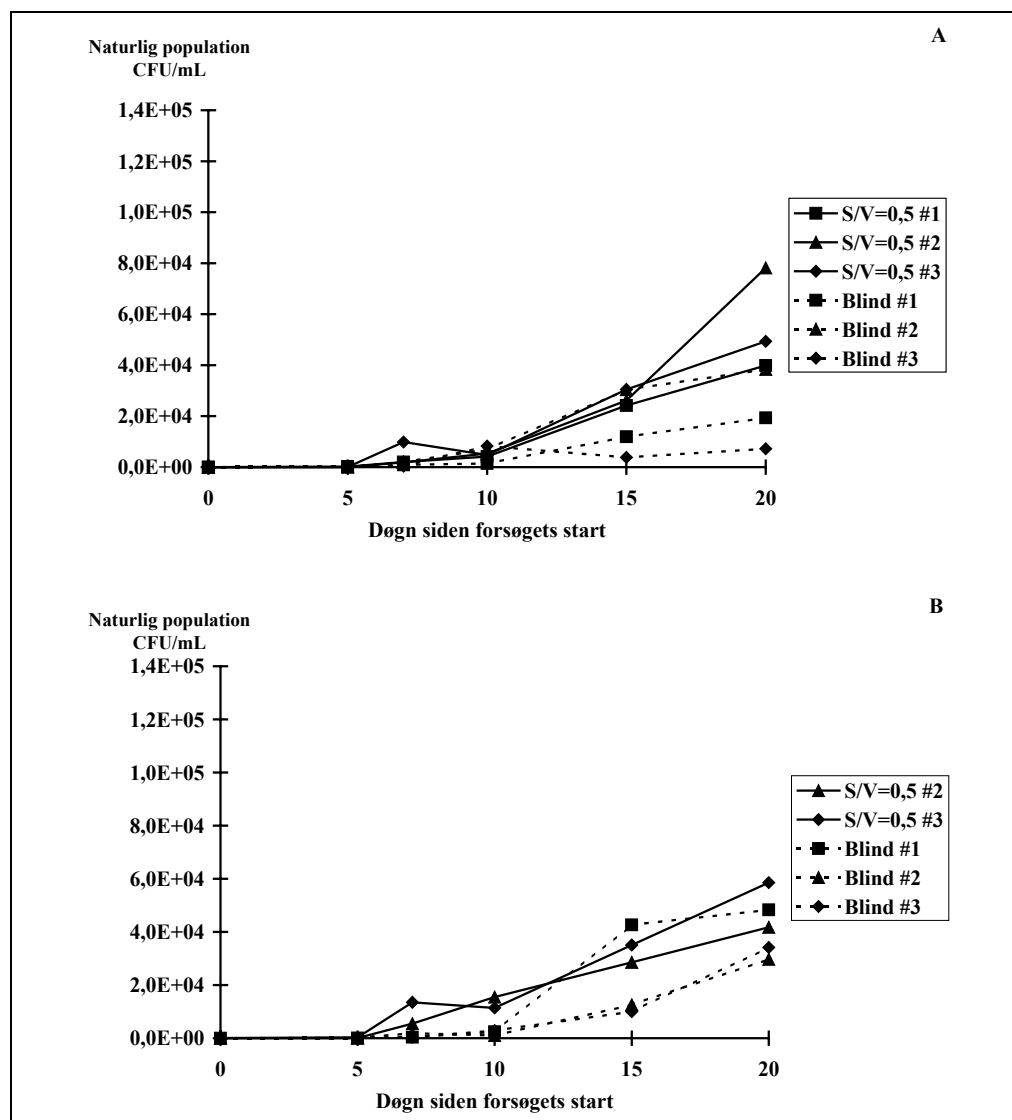
I ekstrakter fremstillet under tilstedeværelse af en naturlig population formede vækstkurverne for naturlige population sig anderledes end for P17 og NOX, idet den naturlige population voksede gennem hele 20 døgnperioden (Figur 8). Dette kan skyldes, at startkoncentrationerne af den naturlige population var langt lavere (<15 CFU/mL) end startkoncentrationerne af P17 og NOX (200-500 CFU/mL).

På trods af at en maksimal bakteriekoncentration formentlig ikke blev opnået, kunne der dag 20 registreres forskel på ekstrakter og blindprøver (Tabel 7).

Der var lidt højere bakteriekoncentrationer i ekstrakterne end i blindprøverne, hvorved afgivelser fra de testede materialer understøttede væksten af den naturlige population.

	PEX	Blind	Blå PEM <sub>(1)</sub>	Blind
Bakteriekoncentration [ $\times 10^4$ CFU/mL]	4,0 7,8 4,9	1,9 0,7	4,2 5,9	4,8 3,0 3,4

Tabel 7: Bakteriekoncentrationer af en naturlig population i ekstrakter med materiale efter 20 døgns ekstraktion ved 10°C uden omrystning og et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>3</sup>.

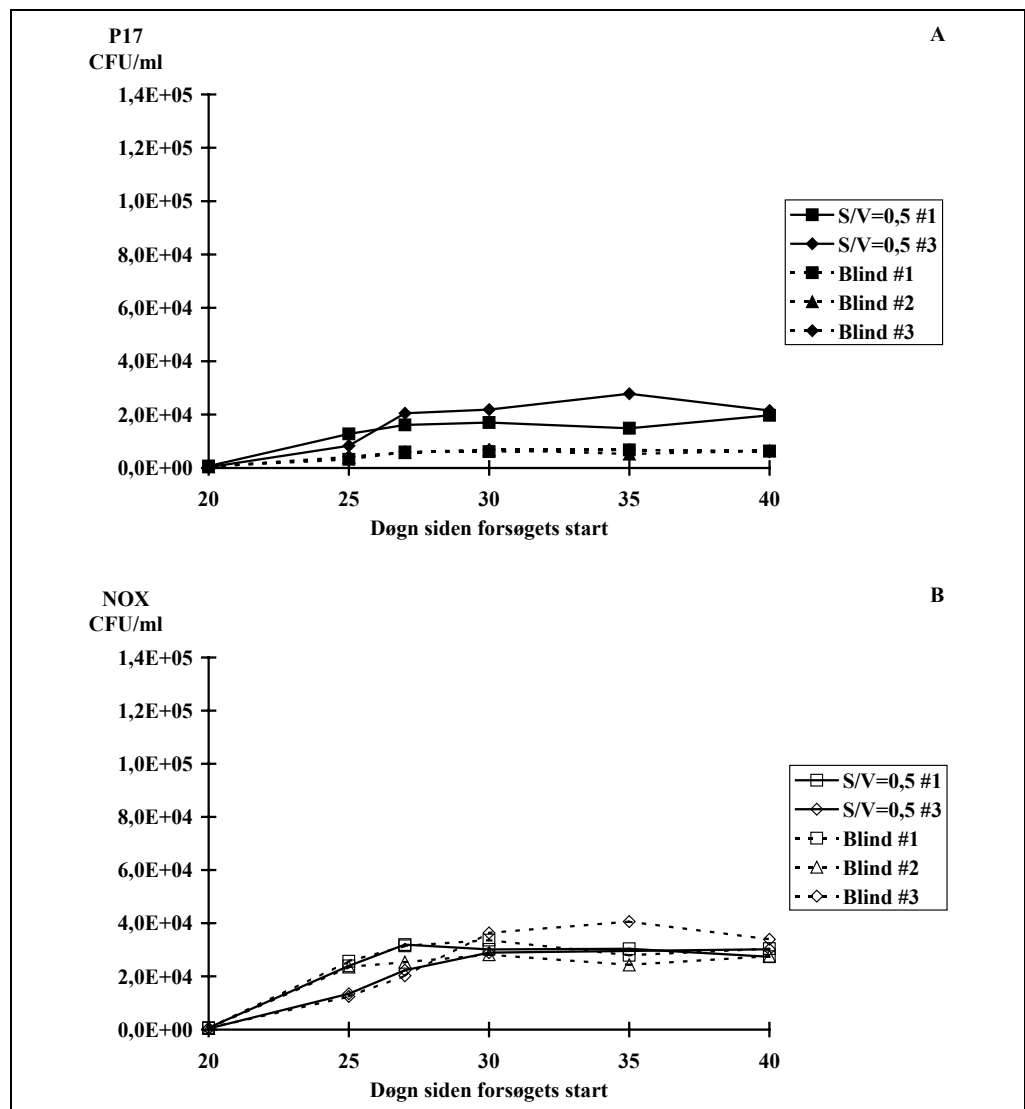


Figur 8: Vækstkurver for en naturlig population under ekstraktion af PEX materiale (A) og blå PEM<sub>(1)</sub> materiale (B). Ekstraktionen forløb ved 10°C uden omrystning.

Da vækstkurverne for den naturlige population ikke stagnerede eller faldt gennem 20 døgn, var alt tilgængeligt substrat formodentligt ikke blevet omsat. Dette blev bekræftet ved den efterfølgende AOC-bestemmelse. Denne blev foretaget dag 20, efter at teststykkerne var taget op og alle ekstrakterne var pasteuriseret på ny. Der var tilgængeligt substrat nok tilbage i vandfasen til, at både P17 og NOX kunne øge deres bakteriekoncentrationer.

Vækstkurverne for P17 og NOX i de pasteuriserede ekstrakter (Figur 9 og Figur 10) havde samme forløb, som vækstkurverne i ekstrakterne fremstillet uden aktive bakterier (Figur 4 og Figur 5). Ligeledes var koncentrationen af P17 højere i ekstrakterne end i blindprøverne. Bakteriekoncentrationerne af både P17 og NOX lå på et lavere niveau i samtlige pasteuriserede ekstrakter, end i ekstrakter fremstillet uden aktive bakterier, hvilke indikerede, at den naturlige population havde kunne omsætte et bredt spektrum af de organiske forbindelser.

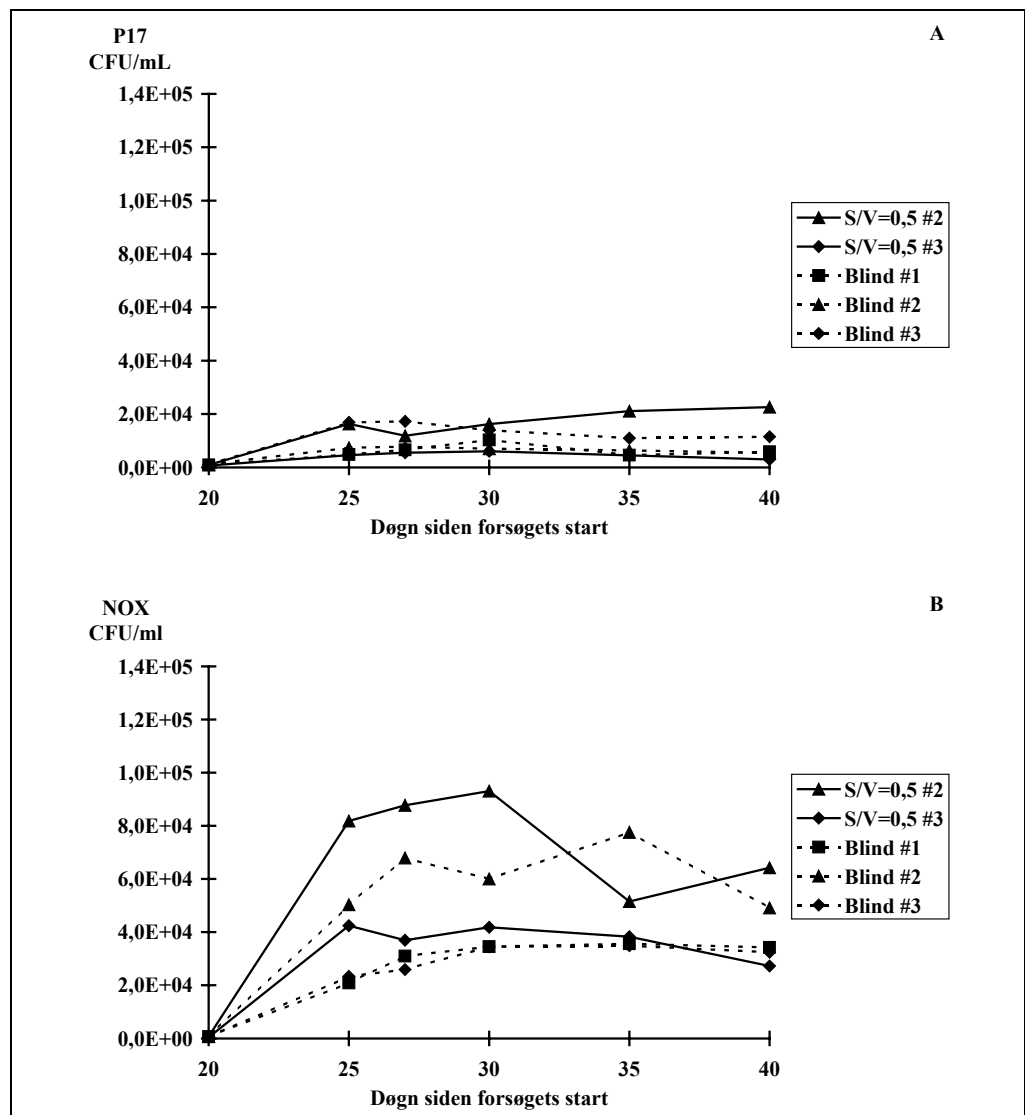
Ved beregning af maksimale gennemsnitlig AOC-værdier (Tabel 8) var der efter den naturlige populations vækst et bidrag fra materialet tilbage på 3 µg acetat-C/L for PEX og 18µg acetat-C/L for blåt PEM<sub>(1)</sub>. For ekstrakter fremstillet uden aktive bakterier blev der for begge materialer opnået 19 µg acetat-C/L (Tabel 5). Den naturlige population kunne således i langt højere grad omsætte stoffer frigivet fra PEX materialet end fra det blå PEM<sub>(1)</sub> materiale.



Figur 9: Vækstkurver for P17 (A) og NOX (B) i ekstrakter af PEX materiale fremstillet under tilstedeværelse af en naturlig population og i tilhørende blindprøver. Ekstraktionen forløb over 20 døgn ved 10°C uden omrystning. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne pasteuriseret, podet med P17 og NOX og inkuberet ved 15°C.

Materiale	[µg acetat-C/L]					
	+ blindværdi			- blindværdi		
	AOC <sub>P17</sub>	AOC <sub>NOX</sub>	AOC <sub>Total</sub>	AOC <sub>P17</sub>	AOC <sub>NOX</sub>	AOC <sub>Total</sub>
PEX	5	3	8	3	0	3
Blind	2	3	4			
Blå PEM <sub>(1)</sub>	18	6	24	15	3	18
Blind	3	3	6			

Tabel 8: Gennemsnitlige AOC-værdier i ekstrakter fremstillet under tilstedeværelse af en naturlig population. Ekstraktionen blev udført over 20 døgn ved 10°C uden omrystning og ved et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>3</sup>. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne pasteuriseret, podet med P17 og NOX og inkuberet ved 15°C.



Figur 10: Vækstkurver for P17 (A) og NOX (B) i ekstrakter af blå PEM<sub>(1)</sub> materiale fremstillet under tilstedeværelse af en naturlig population og tilhørende blindprøver. Ekstraktionen forløb over 20 døgn ved 10°C uden omrystning. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne pasteuriseret, podet med P17 og NOX og inkuberet ved 15°C.

#### 4.2.4 Diskussion

AOC-værdier opnået ved samtidig ekstraktion og AOC-bestemmelse var lavere end AOC-værdier i ekstrakter fremstillet uden aktive bakterier. Foruden den allerede omtalte temperatureffekt på bakteriernes væksthastighed er der et andet forhold, der kan have haft betydning. AOC-metoden er designet ud fra, at bakterierne har adgang til den totale mængde substrat fra start (AOC-bestemmelse på ekstrakt). Tilføres substratet i stedet over tid (samtidig ekstraktion og AOC-bestemmelse), vil bakterierne vokse i takt med at substratet tilføres, hvilket giver et andet vækstforløb. Dette kunne der korrigeres for ved at fastlægge udbyttekonstanterne på samme måde. En sådan løsning vil dog være kompliceret at gennemføre i praksis, og da hastigheden, hvormed substratet afgives, sandsynligvis varierer imellem forskellige materialer; vil dette ikke være en brugbar løsning.

I henhold til migrationsstandarden /DS/EN 852-1, 1997/ testes varmtvandsinstallationer ved 60°C. Ved denne temperatur vil det ikke være muligt at udføre ekstraktionerne sammen med aktive bakterier (medmindre der vælges termofile stammer). Fremstilles der vandige ekstrakter, kan testtemperatur derimod vælges vilkårligt, idet ekstraktet kan fremstilles ved den ønskede temperatur, hvorefter AOC-bestemmelsen udføres ved 15°C. Dette giver samtidig mulighed for at ekstrahere materialer under andre forhold, hvor bakterier ikke kan vokse f.eks. ved høje klorkoncentrationer eller ved høj eller lav pH. Ekstraktionen udføres under de ønskede forhold, og efter afklorering af vandet eller indstilling af pH kan AOC-bestemmelsen udføres med testbakterierne.

P17 kan omsætte aminosyrer, letomsættelige carboxylsyrer, carbonhydrater, alkoholer og aromatiske forbindelser, mens NOX kan omsætte de svært-omsættelige carboxylsyrer såsom format, oxalat, glycollat og glyoxylat /van der Kooij et al., 1995/. De forbindelser man kan forvente afgivet fra polymere materialer, er således overvejende stoffer som P17 kan vokse på, hvilket stemmer overens med resultaterne fra undersøgelsen af ekstraktionsmetoder. Materialernes eftervækstpotentiale kan dermed med rimelighed forventes fastlagt som forskellen i  $AOC_{P17}$  imellem ekstrakter og blindprøver. Dette betyder, at undersøgelserne vil kunne udføres med P17 som eneste testbakterie, hvilket vil medføre nedenstående fordele:

- $AOC_{P17}$ -værdier kan sammenlignes direkte imellem prøver
  - da P17 og NOX konkurrerer om de stoffer begge bakteriestammer kan omsætte, vil forholdet imellem startkoncentrationerne af de to bakteriestammer have indflydelse på de maksimalt opnåede bakterieantal i en prøve /van der Kooij, 1990; Boe-Hansen, 1998b/.
- Større præcision på  $AOC_{P17}$ -bestemmelsen
  - ved AOC-bestemmelser med både P17 og NOX på dansk drikkevand, vil der i reglen vokse langt flere NOX end P17 op. Ved bestemmelse af kimal vil fortyndinger med et tælleligt totalt antal kolonier derfor kun medfører få P17-kolonier, hvilket giver stor usikkerhed på fastlæggelsen af  $AOC_{P17}$ -værdien.

Ved ekstraktion af materialerne sammen med en naturlig population blev vandet fra Lyngby vandværk inden anvendelse fortyndet med pasteuriseret testvand for at opnå en tilpas lav startkoncentration af bakterier. Ved at anvende en relativ lav startkoncentration af bakterier var det forventet, at der tydeligere kunne ses en effekt af afgivelserne fra materialerne. En tælling på vand fra Lyngby vandværk foretaget på et senere tidspunkt viste imidlertid, at

dette vand har en naturlig bakteriekoncentration på omkring 200 CFU/mL. Den foretagne fortynding dag 0 har antageligvis således resulteret i en startkoncentration af den naturlige bakteriepopulation på ca. 20 CFU/mL, hvilket var langt lavere end forventet. For at opnå en startkoncentration af den naturlige bakteriepopulation på samme niveau som P17 og NOX (200-500 CFU/mL), skulle testvand udtaget på Lyngby vandværk havde været anvendt uden forudgående fortynding.

Den u hensigtsmæssige lave startkoncentration af den naturlige population kan tildels være skyld i, at der ikke blev opnåede maksimale værdier inden for den 20 døgns periode. Den lave startkoncentration resulterede i en lav initial væksthastighed, hvilket betød at lange inkuberingstider ville have været påkrævet for at opnå maksimale værdier. Den lave startkoncentration kan endvidere have influeret på hvilke bakterietyper, der voksede op og dominerede. Hurtigtvoksende stammer ville i langt højere grad have kunne udkonkurrere langsomtvoksende, end hvis der havde været en større initial koncentration. Desuden kunne der have manglet bakterier specielt gode til at vokse på de stoffer, der blev afgivet fra materialerne.

Ekstrakterne fremstillet med en naturlig population tilstede blev pasteuriseret inden den efterfølgende AOC-bestemmelse. Ved at sammenligne de opnåede AOC-værdier med de tilsvarende værdier opnået i ekstrakterne fremstillet uden aktive bakterier, kan det konstanteres, at pasteurisering af en vandprøve ikke frigiver en betydelig mængde AOC fra de døde celler. En vandprøves naturlige indhold af bakterier har således ikke nogen indflydelse på den AOC-værdi, der måles i prøven.

I tre af CEN-metoderne gennemgået i kapitel 2 er én af parametrene til fastlæggelse af eftervækstpotentialer mængden af fasthæftede bakterier på overfladerne. Teststykkerne af PEX og Blå PEM<sub>(1)</sub> fra ekstraktionen sammen med P17 og NOX og fra ekstraktionen sammen med en naturlig population blev efter endt ekstraktion undersøgt for fasthæftede bakterier /Corfitzen, 1999/. De fundne bakterieniveauer var af en så lille størrelsesorden, at de kunne tilskrives, at der sad en vandfilm tilbage på teststykkerne efter optagning. En kontaktperiode på 20 døgn ved 10°C var således ikke tilstrækkelig til, at et betydende antal bakterier hæftede på materialeoverfladerne. Fasthæftede bakterier var således ikke årsag til forskelle imellem ekstraktionsmetoder, og afgivelsen fra materialerne kan reelt fastlægges ved måling på vandfasen. Grunden til at der ikke blev dannet biofilm på materialeoverfladerne var sandsynligvis den korte ekstraktionstid. For f.eks. KIWA metoden vil der ikke kunne måles biofilm på materialet før 100-200 døgn efter podning.

Sammenholdt med de phosphor-koncentrationer, der generelt er i dansk drikkevand, ville de observerede bakterieantal næppe give anledning til phosphor-mangel (idet bakterierne generelt behøver C, N og P i forholdet 100:10:1). Det blev derfor besluttet ikke at tilsætte phosphor til testvandet. Kontamineringsrisikoen forbundet med tilsætningen af phosphor ville da blive elimineret.

På baggrund af de opnåede resultater fra undersøgelserne med PEX og blåt PEM<sub>(1)</sub> er det hensigtsmæssigt at fastlægge polymere materials eftervækstpotentialer som AOC-værdien i et vandigt ekstrakt af materialet fremstillet uden aktive bakterier. Dette giver mulighed for at anvende vilkårlige testforhold og forenkler tolkningen af bakteriekoncentrationer. AOC-bestemmelsen kan med fordel udføres med P17 alene, da NOX

tilsyneladende ikke kan udnytte de stoffer, som bliver afgivet fra de undersøgte polymere materialer.

Skal eftervækstpotentialet bestemmes ved brug af en naturlig population, skal koncentrationen af aktive bakterier i vandet ikke fortyndes før brug.



# 5 Desinfektion af testmateriale

Det kunne ikke på forhånd udelukkes, at pasteurisering af teststykkerne ved 60°C ville påvirke materialerne, så afgivelsen ville forløbe anderledes end i den virkelige brugssituation. Desuden var der risiko for, at en betydelig del af den mulige afgivelse fra materialerne ville foregå under opvarmningen, og derved ikke blive registreret ved den egentlige ekstraktion. Der blev derfor afprøvet en alternativ metode til desinfektion af teststykkerne.

Klorforbindelser anvendes ved desinfektion af distributionsnet, hvorfor teststykkerne alternativt kunne desinficeres ved henstand i en vandig kloropløsning. Klor kan dog også kunne påvirke materialerne, idet klorforbindelser generelt er kraftigt oxiderende.

For at kunne påvise en eventuel effekt af desinfektion blev der anvendt en kontrol i form af materiale, der ikke blev desinficeret. Dermed kunne undersøgelsen ikke udføres med en renkultur, og der blev i stedet anvendt testvandets naturlige population. Testvandet blev således ikke pasteuriseret inden anvendelse, og ekstraktion og væksten af den naturlige population forløb således samtidig.

## 5.1 Forsøgsgang

I forventning om at sikre et tydeligt respons blev der anvendt et S/V-forhold på 1,0 cm<sup>-1</sup>. Alle teststykker blev for-vasket efter proceduren angivet i afsnit 3.2.3, for efterfølgende at gennemgå én af følgende type videre behandling (jævnfør principskitsen af undersøgelsen på Figur 11):

### *Desinfektion af teststykker ved kloring:*

- Henstand et døgn i en vandig kloropløsning
- Grundig skylning ved overhældning med upasteuriseret testvand

### *Desinfektion af teststykker ved pasteurisering:*

For at forbehandle alle teststykker ens henstod teststykkerne i postevand indtil pasteuriseringen, dvs.:

- Henstand i postevand i et døgn minus pasteuriseringstiden
- Pasteurisering i postevand (60°C, 30 minutter)
- Grundig skylning ved overhældning med upasteuriseret testvand

### *Ingen desinfektion af teststykker:*

For at forbehandle alle teststykker ens henstod teststykkerne også her yderligere i postevand:

- Henstand et døgn i postevand
- Grundig skylning ved overhældning med upasteuriseret testvand

Efter skylningen i upasteuriseret testvand blev teststykkerne overført til testflasker med upasteuriseret testvand. Blindprøver omfattede ballastmateriale forbehandlet uden desinfektion, idet der blev antaget, at de forskellige typer desinfektion ikke havde indflydelse på ballastmaterialet. Undersøgelsen blev udført af to omgange med to forskellige materialer og klorkoncentrationer:

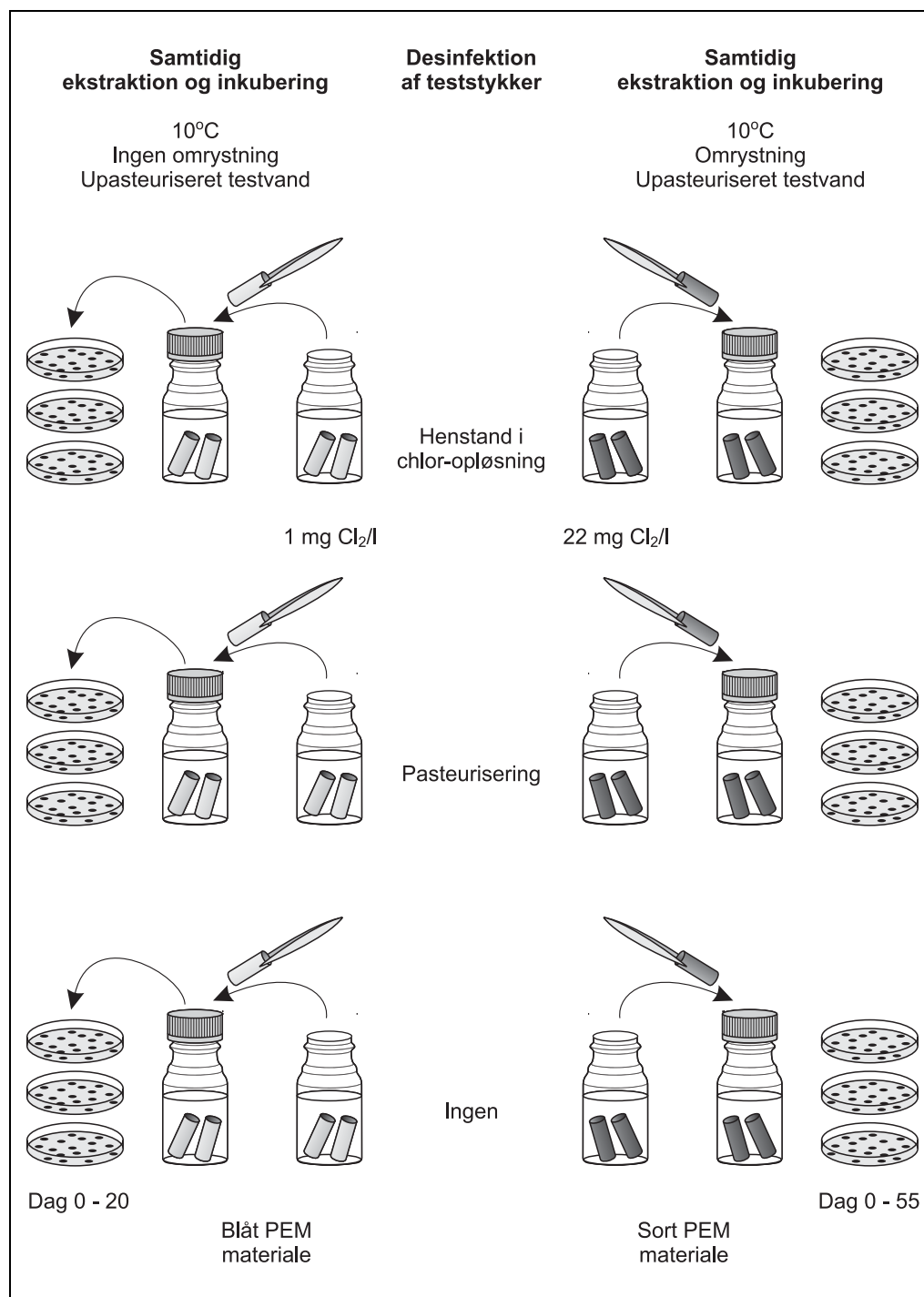
#### *Lav klorkoncentration*

Undersøgelsen blev udført med blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale og med en 1 mg/L kloropløsning (vandig opløsning af Ca(OCl)<sub>2</sub> indeholdende 35% aktivt klor), svarende til opløsning anvendt til desinfektion af testudstyr af Bellen et al. /1993/. Bakteriekoncentrationen blev fulgt over 20 dages ekstraktion ved 10°C i mørke, hvor flaskerne henstod uden omrystning.

#### *Høj klorkoncentration*

Undersøgelsen blev udført med sort PEM materiale og med en 22 mg/L kloropløsning (fortyndet natriumhypoklorit-opløsning indeholdende 1% aktivt klor), svarende til koncentration anvendt ved desinfektion af ledningsnet. Bakteriekoncentrationen blev fulgt over 55 døgns ekstraktion ved 10°C i mørke med omrystning (95 omdrejninger/min).

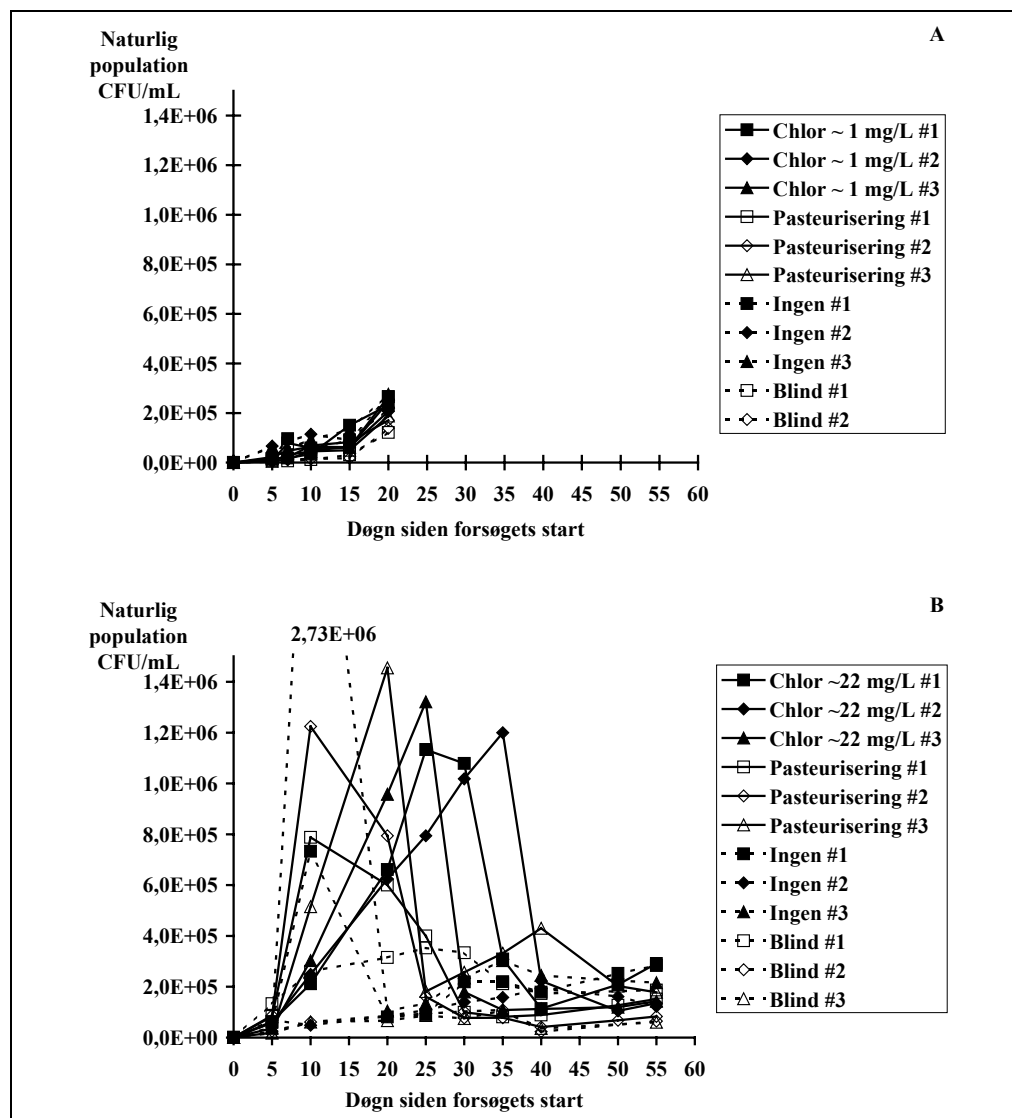
Kimtalsbestemmelser blev udført som ved en AOC-bestemmelse, og udstrykningerne blev inkuberet ved 25°C i 14 døgn.



Figur 11: Principskitse af undersøgelsen af desinfektionsmetoder, jævnfør ovenstående tekst.

## 5.2 Resultater

Bakteriekoncentrationer for den naturlige population er angivet i Bilag H.



Figur 12: Vækstkurver for en naturlig population i ekstrakter og blindprøver under ekstraktion af materiale. Ekstraktionen foreløb ved 10°C ved et S/V-forhold på 1,0 cm<sup>3</sup>, hvor materialet dels ikke var desinficeret og dels desinficeret ved pasteurisering eller ved henstand i en kloropløsning. A: blå PEM<sub>(1)</sub> materiale, 1 mg/L kloropløsning, ekstraktionen foreløb uden omrystning. B: sort PEM materiale, 22 mg/L kloropløsning, ekstraktionen foreløb med omrystning.

Kloropløsningen på 1 mg/L var ikke tilstrækkelig til at desinficere teststykkerne, idet der ved en udpladning kunne konstateres aktive bakterier i kloropløsningen efter et døgn henstand (data ikke vist). Under ekstraktionen af blå PEM<sub>(1)</sub> i upasteuriseret testvand stagnerede vækstkurverne for den naturlige population ikke i løbet af testperioden (Figur 12A), og det kunne således ikke antages, at maksimale bakteriekoncentrationer blev opnået. Der var en mindre forskel på bakteriekoncentrationerne i ekstrakter og blindprøver. Dag 20 var der statistisk signifikant flere bakterier i ekstrakter end i blindprøver testet ved en ensidet variansanalyse på 5 % signifikansniveau.

Sammenlignes bakteriekoncentrationerne for dag 20 (Tabel 9), var der en vis gruppering efter typen af behandling, hvor 'ingen desinfektion' af teststykkerne gav de højeste bakteriekoncentrationer og 'pasteurisering' de laveste. Denne gruppering var dog ikke statistisk signifikant på 5% signifikansniveau ved en ensidet variansanalyse. Der var således ingen væsentlig effekt af desinfektion på bakteriekoncentrationerne.

	Behandling af testmateriale			
	Kloring 1 mg/L	Pasteurisering	Ingen Desinfektion	Blind
Bakterie-	2,3	2,7	2,7	1,2
koncentration	2,1	1,7	2,2	1,4
[ $\times 10^5$ CFU/mL]	2,5	1,9	2,8	

Tabel 9: Bakteriekoncentrationer af en naturlig population i ekstrakter med blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale og tilhørende blindprøver efter 20 døgns ekstraktion ved 10°C uden omrystning og ved et S/V-forhold på 1,0 cm<sup>-1</sup>. Materialet var dels ikke desinficeret og dels desinficeret ved pasteurisering eller ved henstand i en 1 mg/L kloropløsning.

Kloropløsningen på 22 mg/L var tilsyneladende tilstrækkelig til at desinficere teststykkerne, idet der ved en udpladning ikke kunne konstanteres aktive bakterier i kloropløsningen efter et døgn henstand (data ikke vist). Under ekstraktionen af sort PEM i upasteuriseret testvand nåede vækstkurverne for den naturlige population et relativt højt bakterieantal, hvorefter kurverne faldt (Figur 12B), hvilket var et andet forløb end fra undersøgelsen med blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale.

	Behandling af testmateriale			
	Kloring 22 mg/L	Pasteurisering	Ingen desinfektion	Blind
Bakterie-	11,3	7,9	7,3	3,5
koncentration	12,0	12,2	1,9	1,1
[ $\times 10^5$ CFU/mL]	13,2	14,5	(27)	1,1

Tabel 10: Maksimal bakteriekoncentrationer af en naturlig population i ekstrakter og i tilhørende blindprøver under ekstraktion af sort PEM materiale ved 10°C med omrystning og et S/V-forhold på 1,0 cm<sup>-1</sup>. Materialet var dels ikke desinficeret og dels desinficeret ved pasteurisering eller ved henstand i en 22 mg/L kloropløsning.

Sammenlignes de maksimale bakteriekoncentrationer (Tabel 10), var der acceptabel overensstemmelse imellem replika, med undtagelse af ekstrakter med 'ingen behandling' af testmaterialet. Medtages alle data vil der ikke være statistisk signifikant forskel ved en ensidet variansanalyse på 5% signifikansniveau imellem behandlingstyper. Hvis der ses bort fra værdien på  $27 \times 10^5$  CFU/mL for 'ingen desinfektion' var bakteriekoncentrationerne lavere for 'ingen desinfektion' end for desinfektion, mens der ikke var forskel på de to desinfektionsmetoder. Ekstrakterne havde i begge tilfælde højere bakteriekoncentrationer end blindprøverne.

### 5.3 Diskussion

Desinfektion havde ingen effekt på afgivelsen fra blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale ved undersøgelsen med 1 mg Cl<sub>2</sub>/L. For undersøgelsen med sort PEM materiale og 22 mg Cl<sub>2</sub>/L var der for stor variation på replika for 'ingen desinfektion' til, at der entydigt kunne afgøres, hvorvidt der var en effekt af desinfektion. En eventuel effekt må under alle omstændigheder accepteres, da fremstilling af ekstrakter uden tilstedeværelse af aktive bakterier kræver desinfektion af testmaterialet.

For begge PEM materialer var der ikke forskel mellem de maksimale bakteriekoncentrationer som følge af desinfektionsmetoden. Den korte opvarmning og en eventuel oxidation af overfladerne havde således ingen eller samme effekt på afgivelsen, og både pasteurisering og klorning kunne således vælges som desinfektionsmetode. Der er dog en risiko forbundet ved at anvende klorning, da der kan blive overført klorrester med materialet, hvis teststykkerne ikke skylles grundigt nok efter henstand i kloropløsningen. Dette kan hæmme bakterievæksten i testflaskerne, og således resultere i for lave AOC-værdier.

Den store forskel på forløb af vækstkurver i ekstrakterne af henholdsvis blåt PEM<sub>(1)</sub> og sort PEM kunne dels skyldes de forskellige materialetyper, men omrystningen under ekstraktionen af det sorte PEM materiale, kan også have haft effekt. Omrystningen kan have fjernet de afgivende stoffer fra zonen omkring teststykkerne, hvorved stofferne hurtigere er blevet tilgængelige for den naturlige population.

Foretages en generel sammenligning af vækstkurver for den naturlige bakteriepopulation og vækstkurver for P17 og NOX, var der større forskel på niveauet af vækstkurverne imellem ekstrakter og blindprøver ved anvendelse af renkulturer. Anvendelse af renkulturer øger således følsomheden af afprøvningen, når kimtallet opgøres ved udpladning på R<sub>2</sub>A-agar.

Undersøgelserne med blåt og sort PEM materiale viste, at der ikke var forskel på afgivelsen fra materialerne som følge af, om disse var desinficeret ved pasteurisering eller ved henstand i kloropløsning. Der blev derfor fortsat med pasteurisering, som desinfektionsmetode, da denne metode indebærer mindre risiko for introducering af fejlkilder.

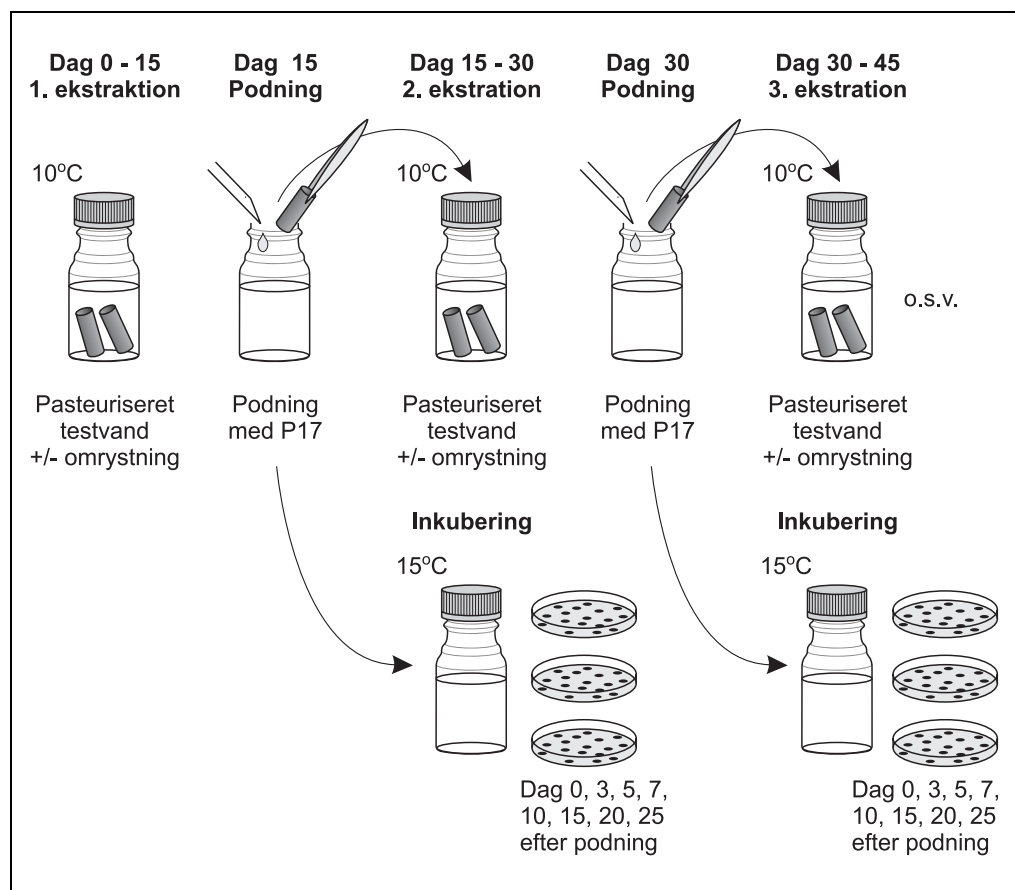
## 6 Sekventielle ekstraktioner

Det blev undersøgt, hvordan afgivelsen fra de polymere materialer forløb over tid. En kraftig initial afgivelse med en efterfølgende negligibel afgivelse vil kun give problemer i forbindelse med ibrugtagning af nye rør, hvor der kan tages de nødvendige forholdsregler. En konstant middelaftgivelse over tid vil derimod betyde en konstant understøttelse af mikrobiologisk vækst, og kan således give anledning til problemer i ledningsnettet over en længere periode. For at kunne undersøge afgivelsen over tid blev et materiale ekstraheret sekventielt, ved at ekstrahere det enkelte sæt teststykker af flere omgange. Desuden blev det undersøgt, om omrystning under ekstraktion af materialet havde effekt på afgivelsen.

### 6.1 Forsøgsgang

Sort PEM materiale blev ekstraheret med og uden omrystning (95 omdrejninger/min) ved to sæt S/V-forhold: 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup>. Materialet blev ekstraheret i perioder á 15 døgn ved 10°C i mørke.

De forbehandlede teststykker (pasteuriseret i 30 minutter) blev fra dag 0 ekstraheret i pasteuriseret testvand. Efter endt ekstraktion blev teststykkerne overført til nyt pasteuriseret testvand, og derefter atter ekstraheret i 15 døgn. Ekstrakterne blev podet med P17, og derefter inkuberet ved 15°C med kimtalsbestemmelse på dag 0, 3, 5, 7, 10, 15 og 25. Der blev udført 4 på hinanden følgende ekstraktioner. I Figur 13 er angivet en principskitse af undersøgelsen med sekventielle ekstraktioner.

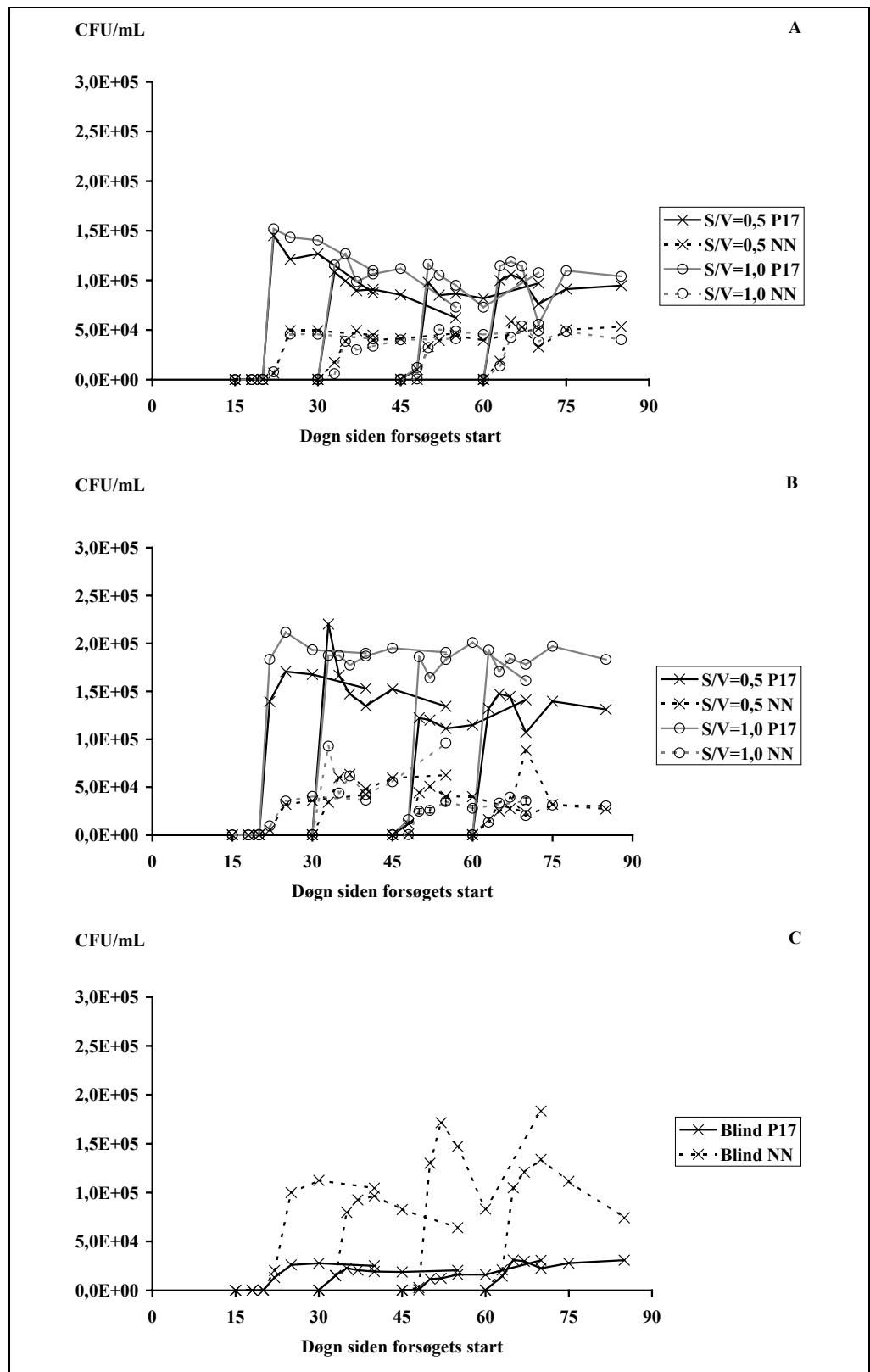


Figur 13: Principskitse af undersøgelsen med sekventielle ekstraktioner, jævnfør ovenstående tekst.

## 6.2 Resultater

Bakteriekoncentrationer og  $AOC_{P17}$ -værdier er angivet i Bilag H.





Figur 14: Gennemsnitlige vækstkurver for P17 og NN i ekstrakter af sort PEM materiale og i tilhørende blodprøver. De sekventielle ekstraktioner forløb over 15 døgn ved 10°C. Efter materialet var taget op og overført til frisk testvand, blev ekstrakterne podet med P17 og indkuberet ved 15°C.  
 A: Vækstkurver i ekstrakter fremstillet uden omrystning.  
 B: Vækstkurver i ekstrakter fremstillet med omrystning.  
 C: Vækstkurver i blodprøver fremstillet med omrystning.

Testvandet i det første sæt ekstrakter var kontamineret med en bakterie (herefter NN), som ikke blev inaktiveret ved pasteurisering i 30 minutter. I testvandet til de øvrige sæt ekstrakter (dag 15-60) lykkedes det inaktivere NN ved at hæve pasteuriseringstiden fra 30 til 45 minutter, men NN blev overført med teststykkerne fra det første sæt ekstrakter til de næste. NN var således tilstede sammen med materialet under ekstraktion, hvorved ekstraktion ikke foregik uden tilstedeværelse af aktive bakterier. Dette havde kun mindre betydning, da NN havde meget ringe vækst ved 10°C, og derfor kun var tilstede i små koncentrationer (< 50 CFU/mL) ved afslutningen af hver ekstraktionsperiode. Når ekstrakterne blev overført til 15°C efter podningen med P17, voksede NN til gengæld op på samme måde som P17. NN dannede 1-2 mm beige-grå kolonier på R<sub>2</sub>A-agar, og kunne således let skelnes fra P17, men blev ikke nærmere identificeret.

I Figur 14 er gennemsnitlige vækstkurver for P17 og NN afbilledet for de udførte ekstraktioner. Kontamineringen med NN medførte, at der ikke kunne beregnes en direkte AOC<sub>P17</sub>-værdi for afgivelsen fra materialet, men niveauet for vækstkurverne var relativt konstant fra 1. til 4. ekstrakt.

### 6.3 Diskussion

Tilstedeværelsen af NN komplicerede fortolkningen af resultaterne, da der var et konkurrenceforhold imellem P17 og NN. I ekstrakterne, hvor der var afgivet stoffer fra materialet, som P17 kunne udnytte, havde P17 en konkurrencemæssig fordel og opnåede højere koncentrationer end NN. I blindprøverne kunne NN bedre konkurrere med P17 om de substrater, begge bakteriestammer kunne omsætte, hvilket medførte, at koncentrationen af NN var højere i blindprøverne end i ekstrakterne. På denne baggrund kunne forskellen i bakteriekoncentrationer mellem ekstrakter og blindprøver ikke direkte benyttes til at fastlægge en AOC-værdi for afgivelsen. Da blindværdierne for P17 fra 1. til 4. sæt imidlertid lå på et stabilt niveau, kunne det afgøres, hvordan afgivelsen fra materialet forløb over tid, ved at sammenligne niveauet for vækstkurverne i 1. til 4. sæt ekstrakter.

Det maksimale antal P17, der blev opnået i ekstrakterne, var på samme niveau i de fire sæt ekstrakter, hvilket indikerede, at der ikke kun var tale om en initial afgivelse, men en kontant afgivelse over de undersøgte 60 døgn ekstraktion. Sammenlignes ekstrakter fremstillet med og uden omrystning, var der en klar effekt som følge af omrystning, idet antallet af P17 i ekstrakterne fremstillet med omrystning var ca. 50% større end i ekstrakter fremstillet uden. Derimod var der ikke den store effekt af S/V-forhold, idet P17 koncentrationer lå på samme niveau i ekstrakter fremstillet med S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup>. Antallet af NN var derimod ikke påvirket af hverken omrystning eller anvendte S/V-forhold, hvilket - sammenholdt med at der blev opnået højere koncentrationer af NN i blindprøverne end i ekstrakterne - indikerede, at NN først og fremmest udnyttede testvandets substrat.

Især for ekstraktioner foretaget med omrystning svingede afgivelsen fra teststykkerne imellem triplikaterne. Dette kunne imidlertid være et udtryk for, at forløbet for afgivelsen varierede lidt imellem de enkelte sæt teststykker, men at den samlede afgivelse over tid ellers i øvrigt kunne være ens. I Tabel 11 er akkumulerede værdier for maksimale bakteriekoncentrationer beregnet efter det 4. ekstrakt (60 døgn ekstraktion) for hvert enkelt sæt teststykker, idet samtlige vækstkurver er medtaget.

I nogle af ekstrakterne blev vækstmaksimum nået allerede på dag 3. Dette betød, at de ekstra indførte kimtalsbestemmelser for nogle af ekstrakterne medførte, at der blev registreret en højere maksimal bakteriekoncentration, end hvis den anden kimtalsbestemmelse først var blevet udført dag 5. En intensivering af kimtalsbestemmelserne kan således medføre en generel stigning i registrerede maksimale bakteriekoncentrationer.

		Akkumulerede maksimale bakteriekoncentrationer									
		HPC [ $\times 10^5$ CFU/mL]				AOC <sub>P17</sub> [ $\mu$ g acetat-C/L]					
		uden omrystning				med omrystning					
		S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>		S/V=1,0 cm <sup>-1</sup>		S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>		S/V=1,0 cm <sup>-1</sup>		Blind	
		HPC	AOC <sub>P17</sub>	HPC	AOC <sub>P17</sub>	HPC	AOC <sub>P17</sub>	HPC	AOC <sub>P17</sub>	HPC	AOC <sub>P17</sub>
P17		4,8	118	5,2	126	6,0	146	3,1	75	2,1	52
		4,7	115	5,1	123	7,4	181	8,0	195	1,6	40
		4,5	109	5,7	137	8,0	213	8,5	206	1,5	38
NN		2,1		4,2		1,4		9,6		13,6	
		2,6		2,5		7,0		5,0		14,4	
		2,0		1,9		3,6		1,9		5,9	

Tabel 11: Akkumulerede maksimale værdier for bakteriekoncentrationerne i ekstrakter af sort PEM materiale beregnet efter 60 døgns ekstraktion (4. ekstrakt). Ekstraktionerne foretog over 15 døgn ved 10°C og ved S/V-forhold på henholdsvis 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup> med og uden omrystning. Efter materialet var taget op og overført til frisk testvand, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C. De akkumulerede kurver kan ses i Bilag D.

De udførte undersøgelser med sort PEM materiale viste, at afgivelsen fra materialet er konstant over 60 døgn, og således ikke foregår som en kraftig initial afgivelse. Endvidere blev det klarlagt, at omrystning under ekstraktion øger afgivelsen fra materialet.

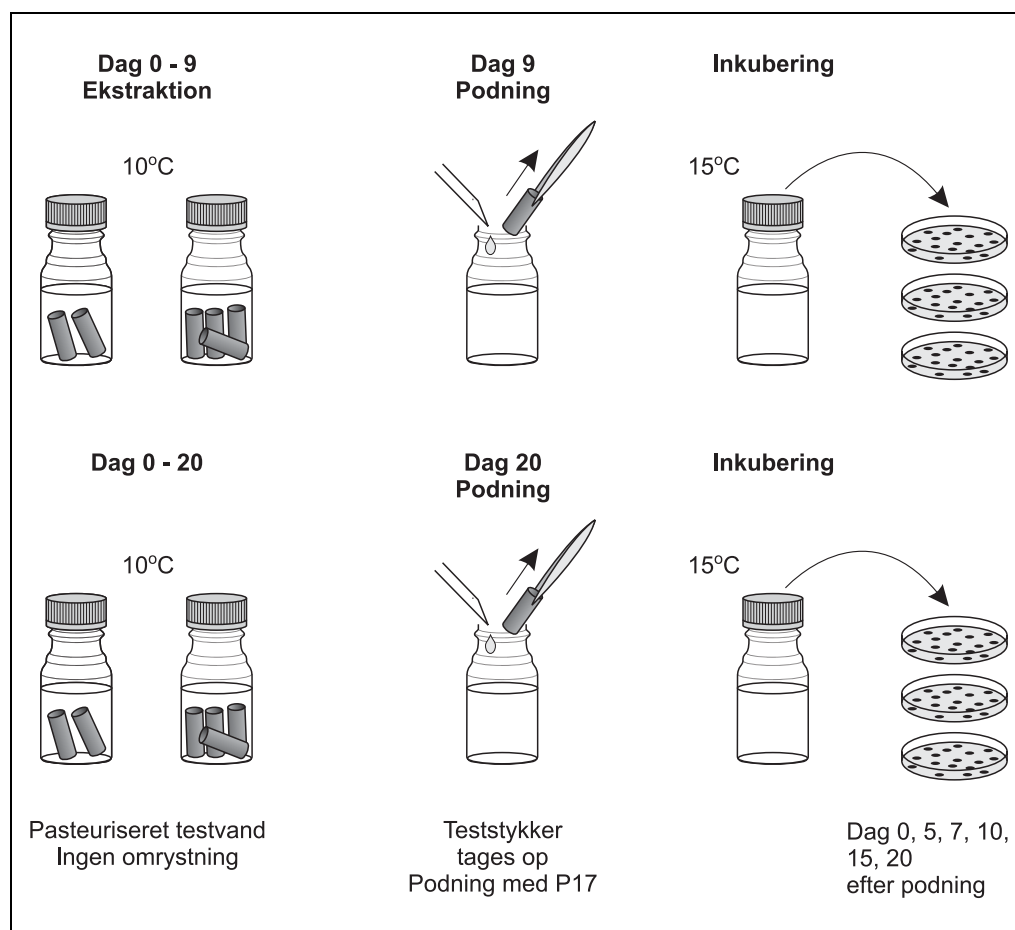


## 7 S/V-forhold

I undersøgelsen med sekventielle ekstraktioner af sort PEM var der ikke den store forskel i P17 koncentration mellem S/V-forhold på henholdsvis 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup>. For at afklare om afgivelsen fra de polymere materialer afhænger af S/V-forholdet, blev der udført en række undersøgelser med varierende S/V-forhold.

Indledningsvis blev det undersøgt, om et andet materiale ville give en lige så lille forskel i P17 koncentration mellem S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup> som sort PEM. Ekstraktionstidens indflydelse på afgivelsens størrelse blev undersøgt ved to forskellige ekstraktionstider.

For at undersøge S/V-forholdets indflydelse for AOC<sub>P17</sub>-afgivelsen blev 7 S/V-forhold undersøgt i intervallet 0,07 - 1,38 cm<sup>-1</sup> med hovedvægt på de mindste S/V-forhold. Udvalgte S/V-forhold blev endvidere undersøgt ved en kortere ekstraktionstid, for at undersøge hvor hurtigt en eventuel mætning kunne indtræde. For at få en bedre bestemmelse af det maksimale kimalt blev kimaltet bestemt flere gange under væksten af P17 end ved tidligere undersøgelser.



Figur 15: Principskitse af undersøgelsen med S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup>, jævnfør nedenstående tekst.

## 7.1 Forsøgsgang

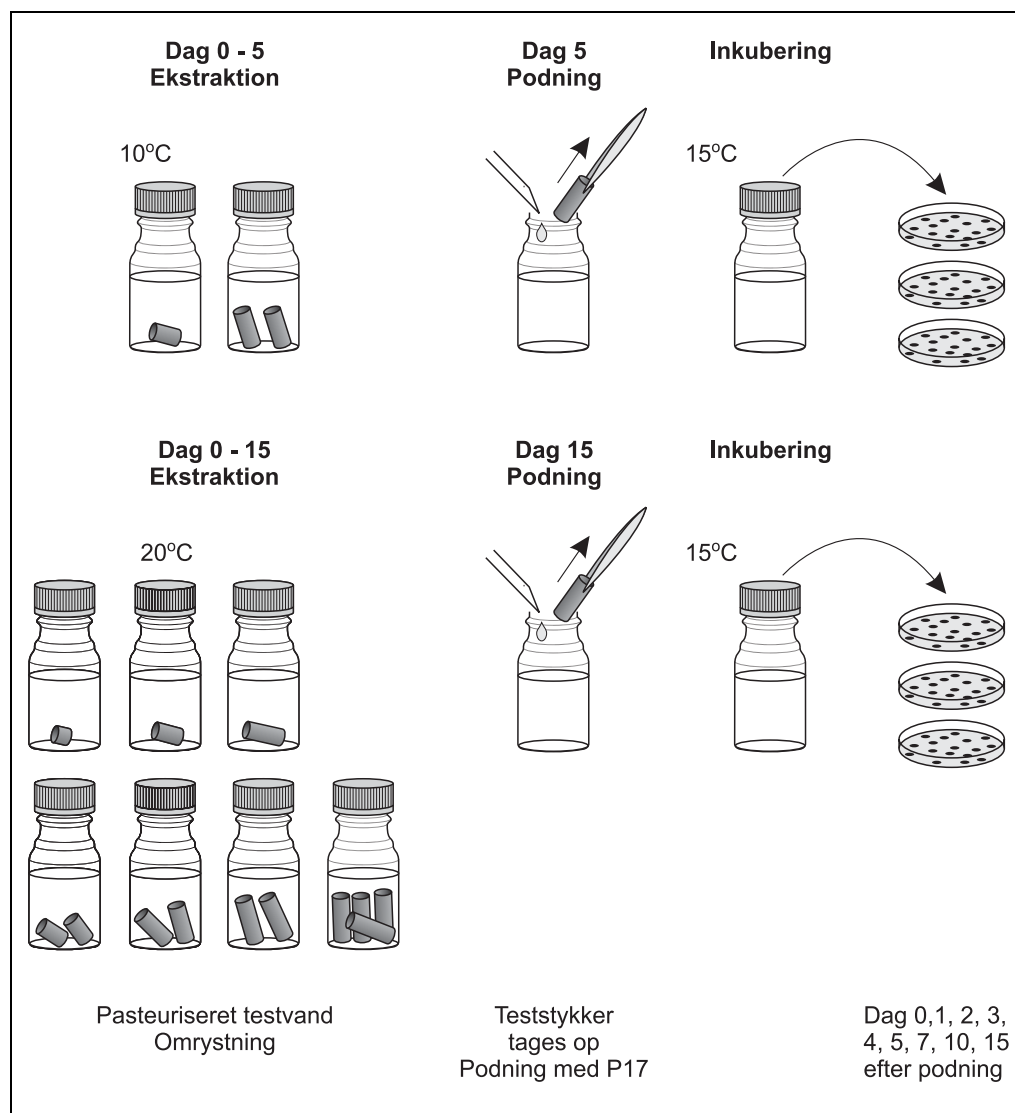
### 7.1.1 S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup>

Undersøgelsen blev udført med blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale. Der blev opstillet 2 sæt prøver i triplikater: Prøver med S/V-forhold på henholdsvis 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup> (teststykker desinficeret ved 30 minutters pasteurisering) og blindprøver kun med ballastmateriale. De to sæt prøver blev ekstraheret over henholdsvis 9 og 20 døgn ved 10°C uden omrystning.

Ekstrakterne blev podet med P17 og inkuberet ved 15°C, hvor væksten af P17 fulgt ved bestemmelse af kimtal dag 0, 5, 7, 10, 15 og 20. Figur 15 angiver en principskitse af forsøgsgangen.

### 7.1.2 S/V-forhold i intervallet 0,06-1,38 cm<sup>-1</sup>

Undersøgelsen blev udført med blåt PEM<sub>(2)</sub> materiale. Der blev opstillet prøver i triplikater for S/V-forholdene 0,07; 0,14; 0,27; 0,41; 0,55; 0,69 og 1,38 cm<sup>-1</sup> samt blindprøver kun med ballastmateriale. Ekstraktionen forløb over 15 døgn ved 20°C med omrystning (95 omdrejninger/min). For S/V-forholdene 0,14 og 0,69 cm<sup>-1</sup> blev der (på et senere tidspunkt) opstillet et ekstra sæt prøver samt blindprøver, der blev ekstraheret i 5 døgn. Ekstrakterne blev podet med P17 og inkuberet ved 15°C, hvor kimtallet blev bestemt dag 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 og for 5 døgn ekstraktionerne endvidere dag 20. Figur 16 angiver en principskitse af forsøgsgangen.



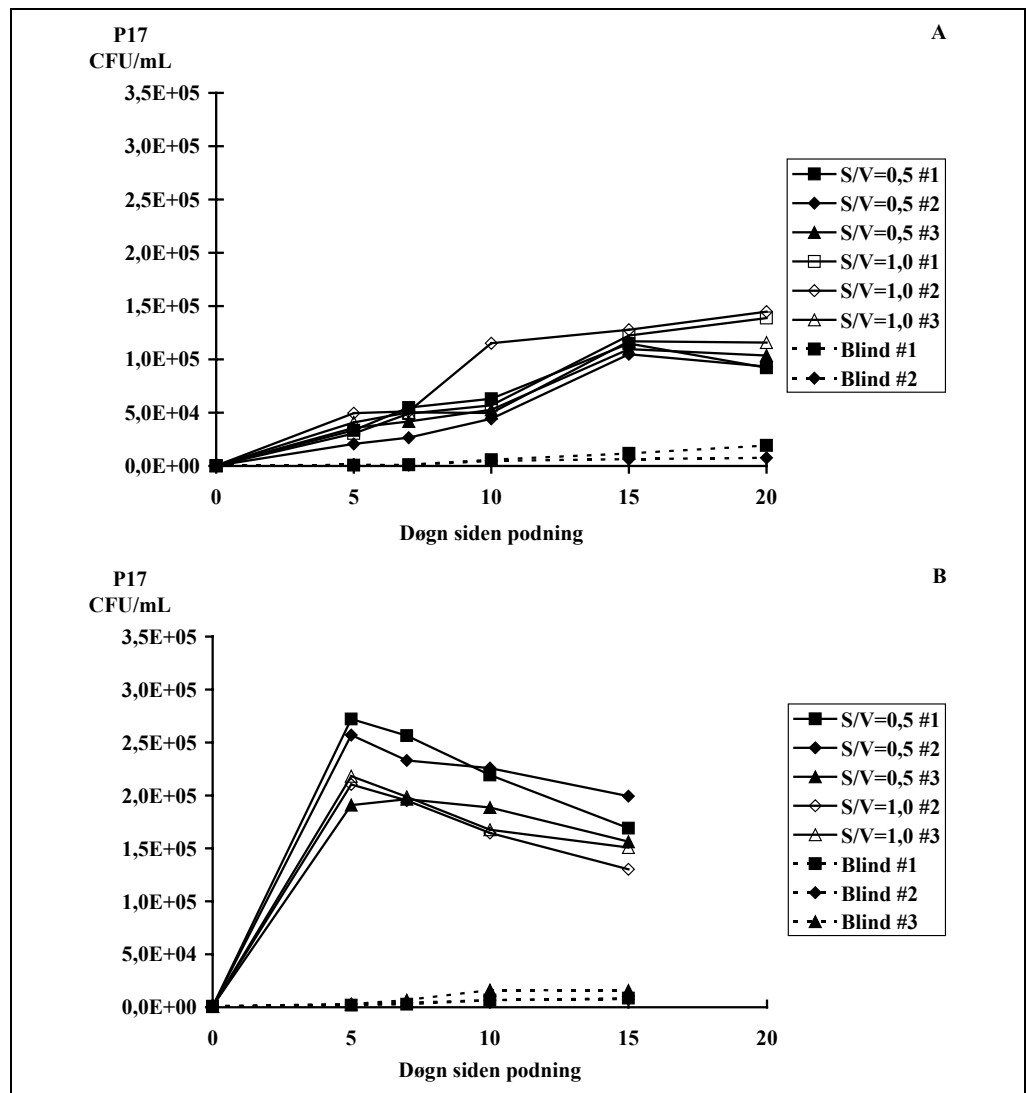
Figur 16: Principalskitse af undersøgelsen med S/V-forhold i intervallet 0,07-1,38 cm<sup>3</sup>, jævnfør ovenstående tekst.

## 7.2 Resultater

Bakteriekoncentrationer og AOC<sub>P17</sub>-værdier er angivet i Bilag H.

### 7.2.1 S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup>

Vækstkurverne for P17 i 9 døgns ekstraktionerne adskilte sig markant fra vækstkurverne i 20 døgns ekstraktionerne (Figur 17). Ligeledes var der tydelig forskel på niveauet for vækstkurver i ekstrakterne og i blindprøverne. Derimod var der ikke den store forskel som følge af S/V-forhold. Med 9 døgns ekstraktion ved S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup> var afgivelsen 24 og 29 µg acetat-C/L, mens den tilsvarende afgivelse med 20 døgns ekstraktion var 56 og 50 µg acetat-C/L (jævnfør Tabel 12). Ved et givent S/V-forhold var fluxen således konstant, idet der blev opnået gennemsnitlige flux af samme størrelsesorden for 9 døgns- og 20 døgns ekstraktionerne (Tabel 13).



Figur 17: Vækstkurver for P17 i ekstrakter af blå PEM<sub>(1)</sub> materiale og i tilhørende blindprøver. Ekstraktionen forløb ved 10°C uden omrystning ved S/V-forhold på henholdsvis 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup>. A: 9 døgns ekstraktion; B: 20 døgns ekstraktion. Efter materialet var taget op blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C.

S/V-forhold	AOC <sub>P17</sub> [µg acetat-C/L]				
	+ blindværdi			- blindværdi	
	0,5 cm <sup>-1</sup>	1,0 cm <sup>-1</sup>	Blind	0,5 cm <sup>-1</sup>	1,0 cm <sup>-1</sup>
9 døgns ekstraktion	27	33	3	24	29
20 døgns ekstraktion	59	52	3	56	50

Tabel 12: Gennemsnitlige AOC<sub>P17</sub>-værdier i ekstrakter af blå PEM<sub>(1)</sub> materiale og i tilhørende blindprøver. Ekstraktionen forløb ved 10°C uden omrystning ved S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup> og ekstraktionsperioder på 9 og 20 døgn. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C.

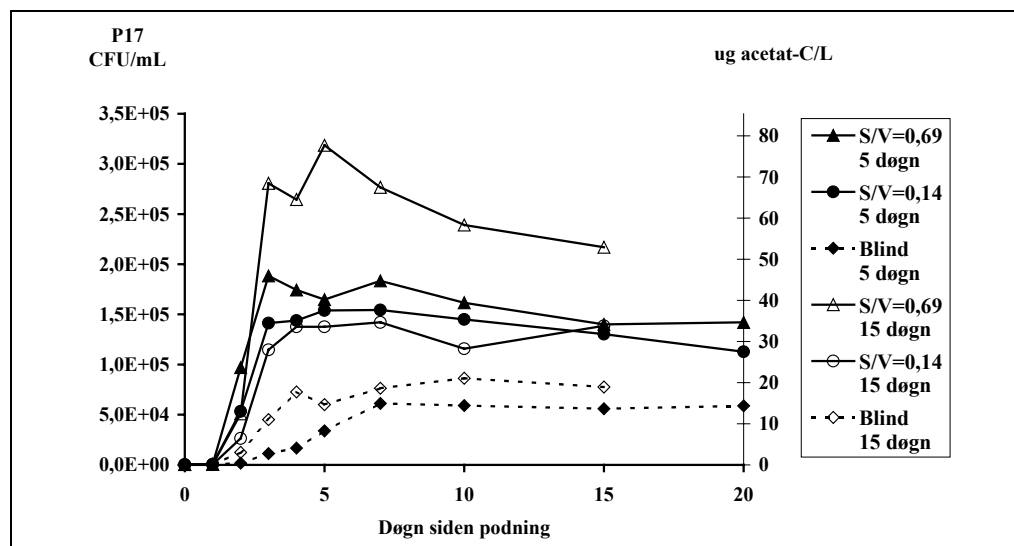


S/V-forhold	Gennemsnitlig flux [ $\times 10^{-3} \mu\text{g acetat-C/cm}^2/\text{d}$ ]	
	0,5 $\text{cm}^{-1}$	1,0 $\text{cm}^{-1}$
9 døgns ekstraktion	5,2	3,2
20 døgns ekstraktion	6,6	2,5

Tabel 13: Gennemsnitlige flux for blåt  $\text{PEM}_{(1)}$  materiale. Ekstraktionen forløb ved  $10^\circ\text{C}$  uden omrystning ved S/V-forhold på 0,5 og  $1,0 \text{ cm}^{-1}$  og ekstraktionsperioder på 9 og 20 døgn. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved  $15^\circ\text{C}$ .

### 7.2.2 S/V-forhold i intervallet $0,07\text{-}1,38 \text{ cm}^{-1}$

Vækstkurverne for P17 i 5 døgns ekstraktionerne adskilte sig markant fra vækstkurverne i blindprøverne (Figur 18), og 5 døgns ekstraktion var således tilstrækkeligt til at observere en afgivelse fra materialet. Der var endvidere forskel på afgivelsen som følge af S/V-forhold; for S/V-forholdet  $0,14 \text{ cm}^{-1}$  blev der målt  $23 \mu\text{g acetat-C/L}$  og for S/V-forholdet  $0,69 \text{ cm}^{-1}$   $31 \mu\text{g acetat-C/L}$  (Tabel 14).



Figur 18: Sammenligning af gennemsnitlige vækstkurver for P17 i ekstrakter af blåt  $\text{PEM}_{(2)}$  materiale og i tilhørende blindprøver fremstillet med 5 og 15 døgns ekstraktion. Ekstraktionen forløb ved  $20^\circ\text{C}$  med omrystning. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved  $15^\circ\text{C}$ .

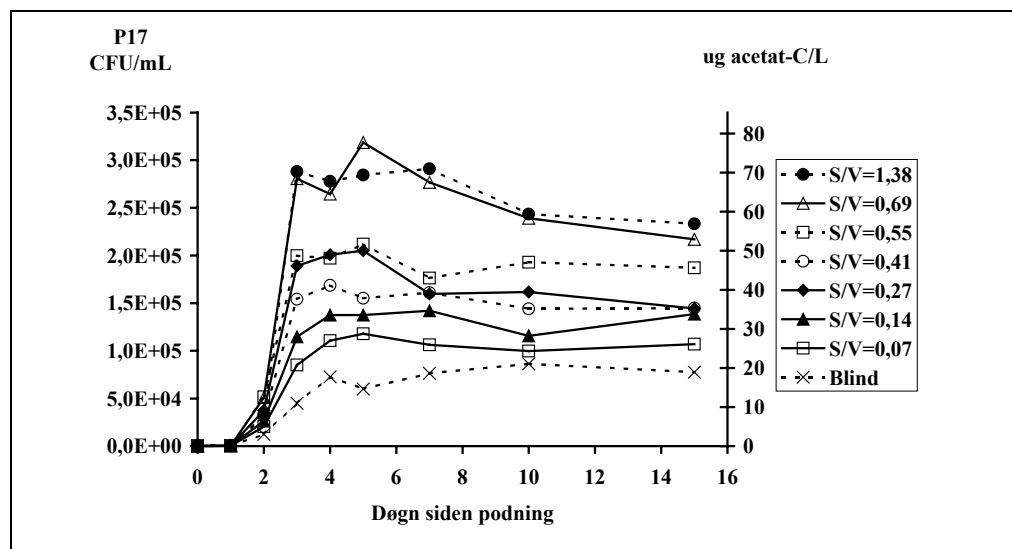
Ved S/V-forhold på  $0,14 \text{ cm}^{-1}$  var afgivelsen  $23 \mu\text{g acetat-C/L}$  ved 5 døgns ekstraktion og  $14 \mu\text{g acetat-C/L}$  ved 15 døgns ekstraktion. Ved S/V-forhold på  $0,69 \text{ cm}^{-1}$  var afgivelsen  $31 \mu\text{g acetat-C/L}$  ved 5 døgns ekstraktion og  $57 \mu\text{g acetat-C/L}$  ved 15 døgns ekstraktion. Afgivelsen var således lavere med 15 døgns ekstraktion end med 5 døgn ved S/V-forhold på  $0,14 \text{ cm}^{-1}$ , men højere ved S/V-forhold på  $0,69 \text{ cm}^{-1}$  (Figur 18 og Tabel 14).

S/V[cm <sup>-1</sup> ]	AOC <sub>P17</sub> [µg acetat-C/L]			
	15 døgns ekstraktion		5 døgns ekstraktion	
	+ blindværdi	- blindværdi	+ blindværdi	- blindværdi
0,07	29	8		
0,14	35	14	38	23
0,27	50	29		
0,41	41	20		
0,55	52	31		
0,69	78	57	46	31
1,38	71	50		
Blind	21	-	15	

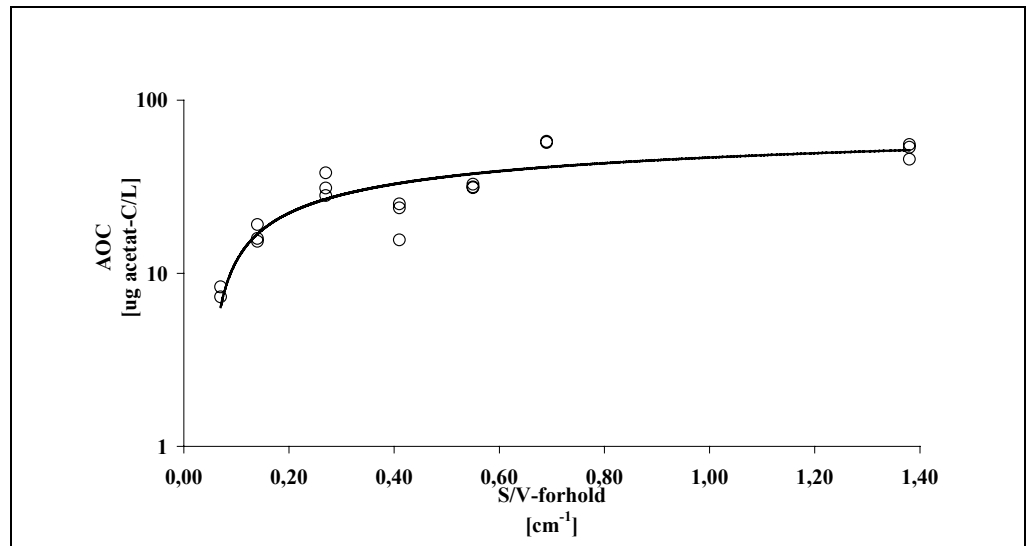
Tabel 14: Gennemsnitlige AOC<sub>P17</sub>-værdier i ekstrakter af blåt PEM<sub>(2)</sub> materiale og tilhørende blindprøver. Ekstraktionen forløb ved 20°C med omrystning ved varierende S/V-forhold og med ekstraktionsperioder på 5 og 15 døgn. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C.

Vækstkurverne for P17 i 15 døgns ekstraktionerne adskilte sig ligeledes markant fra vækstkurverne i blindprøverne, og der var en tydelig effekt af varierende S/V-forhold (Figur 19). Der var en klar tendens til, at den målte AOC<sub>P17</sub>-værdi i vandfasen var større med stigende S/V-forhold (Figur 20 og Tabel 14), dog med en indikation af, at der optrådte en form for mætning af vandfasen med stigende S/V-forhold.

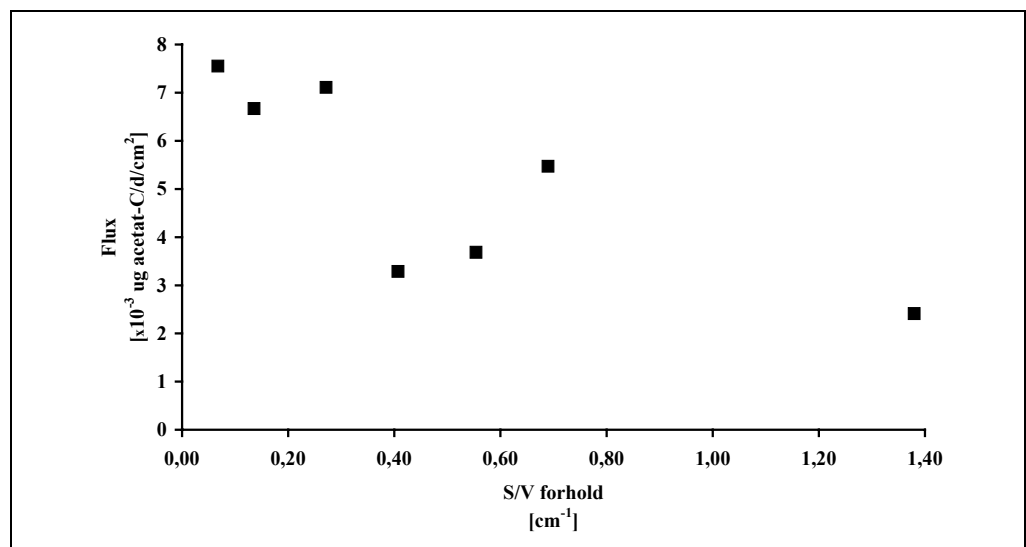
Såfremt afgivelsen fra materialerne er konstant per overfladeareal uanset anvendte S/V-forhold, ville en afbildning af flux som funktion af S/V-forhold resultere i en vandret linie. Beregnes flux for de anvendte S/V-forhold opnås imidlertid en omvendt proportional sammenhæng imellem flux og S/V-forhold (Figur 21 og Tabel 15), hvilket igen indikerer at afgivelsen til vandfasen falder med stigende S/V-forhold.



Figur 19: Gennemsnitlige vækstkurver for P17 i ekstrakter af blåt PEM<sub>(2)</sub> materiale fremstillet med forskellige S/V-forhold og i tilhørende blindprøver. Ekstraktionen forløb over 15 døgn ved 20°C med omrystning. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C.



Figur 20: Afgivelse fra blåt PEM<sub>(2)</sub> materiale som funktion af anvendte S/V-forhold (de enkelte ekstrakteres AOC<sub>P17</sub>-værdi er fratrukket gennemsnittet af bl indværdierne). Ekstraktionen forløb over 15 døgn ved 20°C med omrystning ved varierende S/V-forhold. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C. Bemærk logaritmisk skala og indlagte logaritmiske tendenskurve.



Figur 21: Gennemsnitlige flux for blåt PEM<sub>(2)</sub> materiale som funktion af anvendte S/V-forhold (bl indværdier fratrukket inden beregning). Ekstraktionen forløb over 15 døgn ved 20°C med omrystning ved varierende S/V-forhold. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C.

S/V-forhold [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Gennemsnitlig flux [ $\times 10^{-3} \mu\text{g acetat-C}/\text{cm}^2/\text{d}$ ]	
	15 døgns ekstraktion	5 døgns ekstraktion
0,07	8,5	-
0,14	7,0	66,9
0,27	7,9	-
0,41	3,4	-
0,55	3,8	-
0,69	5,6	9,0
1,38	2,4	-

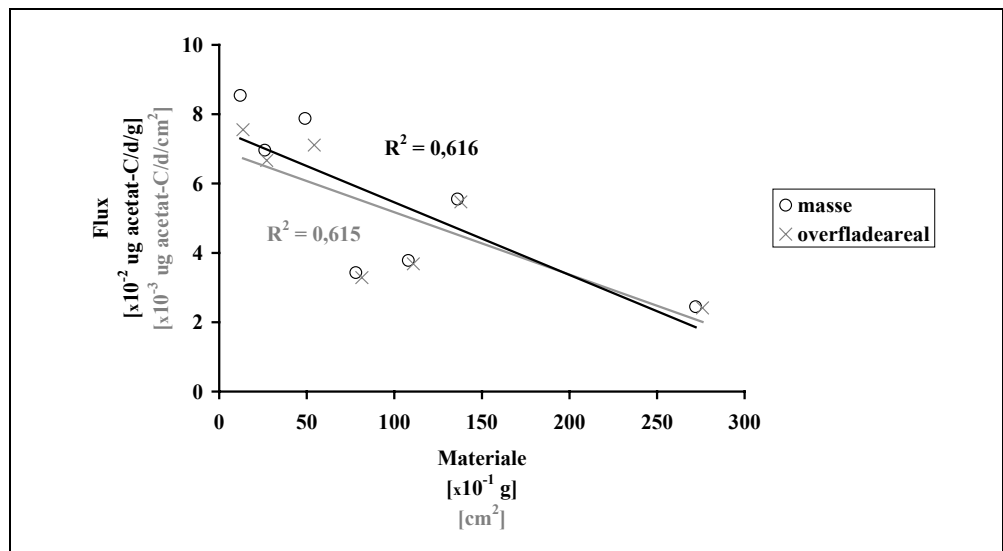
Tabel 15: Gennemsnitlige flux for blåt PEM<sub>(2)</sub> materiale. Ekstraktionen forløb ved 20°C med omrystning ved varierende S/V-forhold og med ekstraktionsperioder på 5 og 15 døgn. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C.

### 7.3 Diskussion

Undersøgelserne indikerede klart, at afgivelsen per overfladeareal er omvendt proportional med det anvendte S/V-forhold. Desuden ser det ud til, at der eksisterer et øvre S/V-forhold, hvorover der ved højere S/V-forhold ikke afgives væsentligt mere til vandfasen ved en given ekstraktionstid.

Der er ikke nogen oplagt forklaring på de observerede sammenhænge imellem afgivelse og S/V-forhold. En tese kunne være, at vandfasen ved et givent S/V-forhold mættes med substrat, og man derfor ikke ville se en større afgivelse ved anvendelse af højere S/V-forhold. Dette kunne forklare, at der ikke var forskel på afgivelserne ved S/V-forhold på 0,5 og 1,0  $\text{cm}^{-1}$  (Figur 17), og at koncentrationen i vandfasen ikke steg ved S/V-forhold over 0,69  $\text{cm}^{-1}$  i undersøgelsen af syv S/V-forhold (Figur 20). Denne tese afvises dog af, at flux for de syv S/V-forhold viste en klar tendens til en omvendt proportional sammenhæng imellem flux og S/V-forhold over alle de undersøgte S/V-forhold (Figur 21) - hvis tesen havde været korrekt, ville fluxen have været konstant indtil det S/V-forhold, der gav mætning, for derefter at aftage med stigende S/V-forhold. Endvidere ville der ikke være blevet registreret større afgivelser ved 20 døgns ekstraktion end ved 9 døgns ekstraktion, såfremt den manglende forskel imellem S/V-forhold ved 9 døgns ekstraktion kunne forklare med en mætning af vandfasen allerede ved S/V-forhold på 0,5  $\text{cm}^{-1}$  (Tabel 12). En anden tese kunne være, at omsætningen af de afgivne stoffer frembragte toksiske metabolitter, som hæmmede videre vækst af P17. Dette stemmer dog ikke overens med resultaterne fra 9 og 20 døgns ekstraktion, hvor der i givet fald ikke skulle kunne måles højere P17 koncentrationer i vandfasen i 20 døgns ekstrakterne. Det er ud fra de opnåede resultater ikke muligt at fastlægge, hvorledes afgivelsen afhænger af S/V-forholdet, men afgivelsen vil givetvis være en balance mellem følgende faktorer:

- Opløselighed og polaritet af de afgivne stoffer
- Afgivelseshastighed, som formentlig er afhængig af en koncentrationsgradient
- Grænselaget ved materialeoverfladen



Figur 22: Flux for 15 døgns ekstraktioner af blåt PEM<sub>(2)</sub> materiale fremstillet ved forskellige S/V-forhold afbildet som funktion af henholdsvis overfladeareal og masse. Ekstraktionerne blev udført ved 20°C med omrystning, og den efterfølgende vækst af P17 foregik ved 15°C.

Ved 20 døgns ekstraktion uden omrystning af blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale ved 10°C og et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup> var der ikke væsentlig forskel i afgivelsen mellem S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup>. Ved 15 døgns ekstraktion med omrystning af blåt PEM<sub>(2)</sub> materiale ved 20°C og et S/V-forhold på 0,55 cm<sup>-1</sup> var der forskel i afgivelsen mellem S/V-forhold på 0,55 og 1,38 cm<sup>-1</sup>, men ikke væsentlig forskel mellem S/V-forhold på 0,69 og 1,38 cm<sup>-1</sup>. Ved hvilket S/V-forhold, videre afgivelse til vandfasen hæmmes, vil således være styret af ekstraktionsforholdene.

Den uventede sammenhæng imellem S/V-forhold og afgivelse kunne måske forklares ved at afgivelsen i højere grad er afhængig af massen af materiale end af overfladearealet. I undersøgelsen med PEM<sub>(2)</sub> var der dog ikke bedre sammenhæng mellem flux og masse end mellem flux og overfladeareal (Figur 22). Snitfladerne udgjorde forskellige andele af det totale overfladeareal ved forskellige S/V-forhold (mellem 3 og 17%), men der var ingen indikation af, at snitfladerne havde signifikant indflydelse på de opnåede flux.

Det øgede antal kimtalsbestemmelser viste eksponentiel vækst de første 2-3 døgn. Undersøgelserne viste desuden, at det er vigtigt at inkludere dag 3 og dag 4 efter podning for at registrere det reelle maksimale bakterieantal. Det maksimale bakterieantal forekommer afhængigt af både substrattypen og koncentrationen efter forskellige inkuberingsperioder, der ikke kan forudsiges. Til eksempel blev det maksimale bakterieantal registreret i de enkelte ekstrakter mellem dag 3 og 7 i undersøgelsen med 7 forskellige S/V-forhold.

Mellem 9- og 20 døgns ekstrakterne var der udover forskellen i koncentrationen af P17 også forskel på vækstkurvernes forløb. I 20 døgns ekstrakterne blev det maksimale antal bakterier opnået efter kort inkubationstid, hvorefter vækstkurverne faldt kraftigt, mens P17 i 9 døgns ekstrakterne voksede støt gennem hele inkuberingsperioden (Figur 17). Erfaringer på IMT viser, at dette gælder generelt for P17 som renkultur; med højere substratkoncentrationer opnås det maksimale antal tidligere i inkuberingsforløbet og vækstkurven falder kraftigere.

Afgivelsen fra polymere materialer til vandfasen steg indtil et givent  $S/V$ -forhold, hvorefter der ikke blev afgivet væsentligt mere til vandfasen, selvom  $S/V$ -forholdet blev øget. Det aktuelle  $S/V$ -forhold er givetvis ikke universelt for hverken materialer eller testforhold. Et  $S/V$ -forhold på  $0,5 \text{ cm}^{-1}$  (svarende til en indre rørdiameter på 4 cm) blev valgt ud fra de udførte forsøg, da dette  $S/V$ -forhold lå i det dynamiske område ved  $20^\circ\text{C}$  og gav et respons signifikant højere end blindværdierne. Umiddelbart havde massen af materialet eller andelen af snitfladearealet ikke større betydning for fluxen end  $S/V$ -forholdet.

## 8 Undersøgelse af udvalgte materialer

Fem polymere materialer blev undersøgt efter metoden gennemgået i afsnit 3.3:

- Blå PEM<sub>(2)</sub>
- Sort PEM
- Lysegrå PVC med bly-stabilisatorer: PVC (Pb)
- Mørkegrå PVC med calcium/zink stabilisatorer: PVC (Zn/Ca)
- Ufarvet PVC med organiske stabilisatorer (prøvekørsel): PVC (Org.)

De to PEM materialetyper havde indgået i de tidligere undersøgelser.

Vækstkurverne for P17 i ekstrakterne (serie 1) kunne ikke direkte omsættes til en AOC-værdi for afgivelsen fra de enkelte materialer på samme måde som i tidligere undersøgelser. Dels var der i nogle tilfælde store afvigelser mellem de enkelte triplikater, og dels svarede vækstkurverne ikke til de tidligere, idet maksimale bakterieantal generelt blev opnået senere i vækstforløbet. Desuden var P17 antallet i en del af ekstrakterne lavere end i blindprøverne. For at undersøge om en hæmningseffekt (f.eks. tilstedeværelsen af toksiske forbindelser) kunne forklare de opnåede vækstkurve, blev alle ekstrakterne dag 29 podet med 100 CFU/L P17 for at påvise tilstedeværelse af P17 (før kimtalsbestemmelse dag 29) og tilsat 1 mL acetatopløsning til en slutkoncentration på ca. 20 µg acetat-C/L. Såfremt der ikke var nogen faktorer, som hæmmede væksten af P17, skulle dette resultere i en tilvækst i AOC på omkring 20 µg acetat-C/L. Bakterieantallet blev bestemt 3 og 5 døgn efter tilsætningen af acetat. Vækstkurver for P17 i ekstrakterne, maksimale AOC<sub>P17</sub>-værdier samt tilvæksten som følge acetatilsætningen ses angivet som serie 1 i Bilag E. Der var ikke entydig sammenhæng imellem hvilke ekstrakter, der havde resulteret i lavere P17 koncentrationer end blindprøverne og hvilke ekstrakter, der gav et lavere antal P17 end forventet som følge af acetatilsætningen. Det var derfor ikke umiddelbart til at konkludere, om resultaterne skyldes tilstedeværelsen af toksiske forbindelser.

Da der var flere faktorer, der viste sig anderledes end forventet i undersøgelsen af de fem materialer, blev forsøget gentaget 3 måneder senere (serie 2) med de samme materialer fra samme batch som i den første undersøgelse. Materialerne havde siden modtagelse fra producenterne været opbevaret indpakket i stanniol ved stuetemperatur. Ekstrakterne blev dag 20 tilsat 1 mL acetatopløsning til en slutkoncentration på ca. 25 µg acetat-C/L for at undersøge tilstedeværelse af hæmmende forbindelser. Vækstkurver for P17 i ekstrakterne, maksimale AOC<sub>P17</sub>-værdier samt tilvæksten som følge acetatilsætningen ses angivet som serie 2 i Bilag E. Der var samme problemer med manglende overensstemmelse imellem triplikater og imellem ekstrakter af materialer og blindprøver som under serie 1, og der blev heller ikke set den forventede tilvækst ved tilsætningen af acetat. De to seriers blindværdier stemte overens, men der var ikke videre overensstemmelse imellem opnåede AOC<sub>P17</sub>-værdier fra serie 1 og serie 2 (jævnfør Tabel 16).

De uventede lave  $AOC_{P17}$ -værdier kunne eventuelt tilskrives faktorer forbundet med selve materialet:

- Afgivelse af forbindelser fra materialet, som kan virke toksiske på bakterier
- Variationer i sammensætningen inden for materialet ved produktion
- Stoffer fra materialet var "afdampet" som følge af opbevaringen

Alle tre punkter kunne med stor sandsynlighed afvises; de første to, da de to PEM materialer havde indgået i tidligere undersøgelser, og havde givet tilfredsstillende resultater med hensyn til overensstemmelse imellem triplikater og med niveauer i forhold til blindværdier; det tredje, da der ikke konsekvent var lavere  $AOC_{P17}$  i serie 2 end i serie 1.

Der blev ikke konstateret kontamineringer med uønskede bakterier ved kimtalsbestemmelserne på R2A-agar med en inkubationstid på 2-3 døgn ved 25°C (senere undersøgelser viste dog, at kontaminerende bakterier først voksede frem på R<sub>2</sub>A-agar, når inkubationstiden blev forlænget til 9-14 døgn, jævnfør Bilag G).

ATP (adopsine triphosphat) findes i alle levende celler og fungerer som cellernes energilager. ATP er således et indirekte mål for bakterieantallet (jævnfør analyseprincip og metode i Bilag F).

ATP-indholdet i prøver fra dag 0 for serie 1 og 2 blev analyseret for at afklare, om de afvigende resultater kunne tilskrives en kontaminering med uønskede bakterier. ATP-niveauer  $\leq 5$  pg ATP/mL er normalniveauet for en ikke-kontamineret drikkevandsprøve podet med P17. De målte ATP-værdier ses i Tabel 16 sammen med de i ekstakterne opnået  $AOC_{P17}$ -værdier.



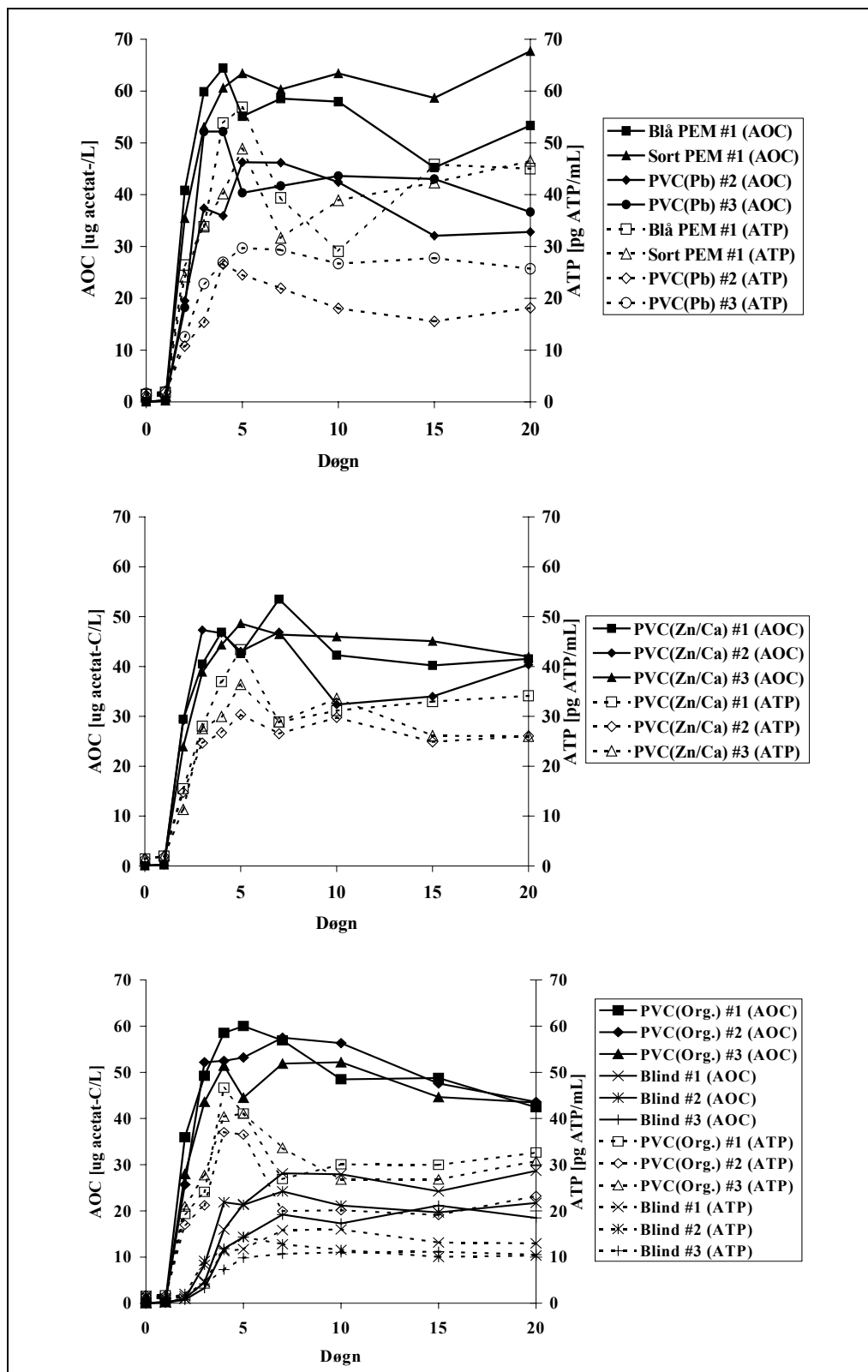
Materiale	Max. AOC <sub>P17</sub>			ATP - dag 0		
	[µg acetat-C/L]			[pg ATP/mL]		
	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 1	Serie 2	Serie 3
Blå PEM 1	36	3	64	≤5	14	≤5
Blå PEM 2	42	11	42	≤5	352	18
Blå PEM 3	67	12	41	≤5	223	17
Sort PEM 1	22	46	63	454	≤5	≤5
Sort PEM 2	7	43	56	129	≤5	13
Sort PEM 3	65	92	54	≤5	≤5	33
PVC(Zn/Ca) 1	15	4	54	936	84	≤5
PVC(Zn/Ca) 2	3	1	47	336	24	≤5
PVC(Zn/Ca) 3	5	3	49	321	137	≤5
PVC(Pb) 1	7	39	11	85	≤5	33
PVC(Pb) 2	1	39	46	817	≤5	≤5
PVC(Pb) 3	0	15	52	74	17	≤5
PVC(Org.) 1	48	13	60	≤5	26	≤5
PVC(Org.) 2	49	4	58	≤5	98	≤5
PVC(Org.) 3	39	40	52	≤5	≤5	≤5
Blind 1	9	10	28	≤5	≤5	≤5
Blind 2	13	14	24	≤5	≤5	≤5
Blind 3	7	8	21	≤5	≤5	≤5

Tabel 16: AOC<sub>P17</sub>-værdier i ekstrakter af polymert materiale (blindværdi ikke fratrukket) samt tilhørende ATP-værdier for dag 0. Ekstraktionerne blev udført ved 20°C over 15 døgn med omrystning, mens væksten af P17 foregik ved 15°C. Skraverede værdier angiver ekstrakter, der har været kontamineret med uønsket bakterier under ekstraktionen.

De forhøjede ATP-værdier for nogle af ekstrakterne viste, at de havde været kontamineret med uønskede bakterier under ekstraktionen, og det var konsekvent disse ekstrakter, hvor AOC<sub>P17</sub>-værdi var lavere end forventet. Dette kan forklares ved, at de kontaminerende bakterier havde opbrugt det tilgængelige substrat, eventuelt allerede under ekstraktionen, så P17 ikke kunne vokse i ekstraktet. Da de kontaminerende bakterier voksede langsommere end P17 på agarpladerne gav de kontaminerende bakterier ingen synlige kolonier ved kort tids inkubering af agarpladerne. ATP-målingen kunne derimod påvise bakteriernes tilstedeværelse.

Ingen af blindprøverne var kontamineret, hvilket kunne tyde på at problemet med overlevelse af uønskede bakterier var forbundet med tilstedeværelsen af materialet. Da tidligere undersøgelser havde været udført med samme batch PEM materialer (hvor der ikke havde været kontamineringer), måtte problemet med overlevelse af uønskede bakterier kunne tilskrives en ændring i det leverede vand - enten selve testvandet eller det postevand, der anvendes til skylning af testmaterialet inden ekstraktionen. Da uønskede bakterier også havde overlevet under undersøgelsen med sekventielle ekstraktioner (jævnfør Kapitel 6), men blev inaktiveret ved at hæve pasteuriseringstiden, blev effekten af forskellige pasteuriseringsforhold og kloring på de uønskede bakterier undersøgt (Bilag G). De pågældende bakterier kunne inaktiveres ved pasteurisering (70°C, 30 min) i vand uden materiale, men kunne overleve, når de blev pasteuriseret i vand med materiale tilstede. Denne observation bekræftede den generelle opfattelse af, at bakterier er mere modstandsdygtige,

når de er fasthæftede. Ud fra den udførte undersøgelse blev det besluttet at gentage undersøgelsen af de fem materialer, idet pasteuriseringen blev ændret til 70°C i 30 min. AOC<sub>P17</sub>-værdier i ekstrakterne samt ATP-værdier for dag 0 ses i Tabel 16.



Figur 23: Vækstkurver for P17 i ekstrakter af 5 forskellige polymere materialer og tilhørende blindprøver afbillet dels som AOC og dels som ATP (kontaminerede prøver sorteret fra). Ekstraktionerne blev udført ved 20°C over 15 døgn med omrystning, mens væksten af P17 foregik ved 15°C.

På trods af ændringen af pasteuriseringen var der i serie 3 fortsat problemer med kontaminering med uønskede bakterier under ekstraktionen. Dog var det en langt mindre del af de uønskede bakterier, der havde kunnet klare den kraftigere pasteurisering, da ATP-værdierne var langt lavere i de kontaminede ekstrakter i serie 3 end i de to forgående serier. Desuden blev ATP målt i de ikke-kontaminede ekstrakter fra serie 3 for alle dage hvor der blev bestemt kimtal. Vækstkurver for P17 er afbilledet dels som AOC og dels som ATP i Figur 23 (ATP-data er angivet i Bilag E). Både målt som CFU og AOC var der markant højere  $AOC_{P17}$  i alle ekstrakterne end i blindprøverne. Den gode overensstemmelse imellem de sammenhørende kurver for AOC og ATP indikerer, at ATP-målinger måske vil kunne erstatte kimtalsbestemmelser.

Materiale	Serie	$AOC_{P17}$ [ $\mu\text{g}$ acetat-C /L]	Gennemsnit [ $\mu\text{g}$ acetat-C /L]	Flux [ $\times 10^3 \mu\text{g}$ acetat-C/d/cm <sup>2</sup> ]
Blå PEM	1	26	33 $\pm$ 6	4,4 $\pm$ 0,8
	1	32		
	1	(58)		
	3	41		
Sort PEM	1	56	41 $\pm$ 9	5 $\pm$ 1
	2	35		
	2	33		
	2	(82)		
	3	40		
PVC(Zn/Ca)	3	30	26 $\pm$ 3	3,5 $\pm$ 0,4
	3	23		
	3	25		
PVC(Pb)	2	28	27 $\pm$ 3	3,6 $\pm$ 0,4
	2	29		
	3	22		
	3	28		
PVC(Org.)	1	38	34 $\pm$ 4	4,5 $\pm$ 0,4
	1	39		
	1	30		
	2	30		
	3	36		
	3	34		
	3	28		

Tabel 17:  $AOC_{P17}$ -værdier opnået i ekstrakter af fem polymere materialer (fratrullet respektive gennemsnitlige blindværdier). Gennemsnit er angivet som aritmetiske gennemsnit med standardafvigelser. Ekstraktionerne blev udført ved 20°C over 15 døgn med omrystning, mens væksten af P17 foregik ved 15°C. Værdier i parenteser indgår ikke i beregning af snit.

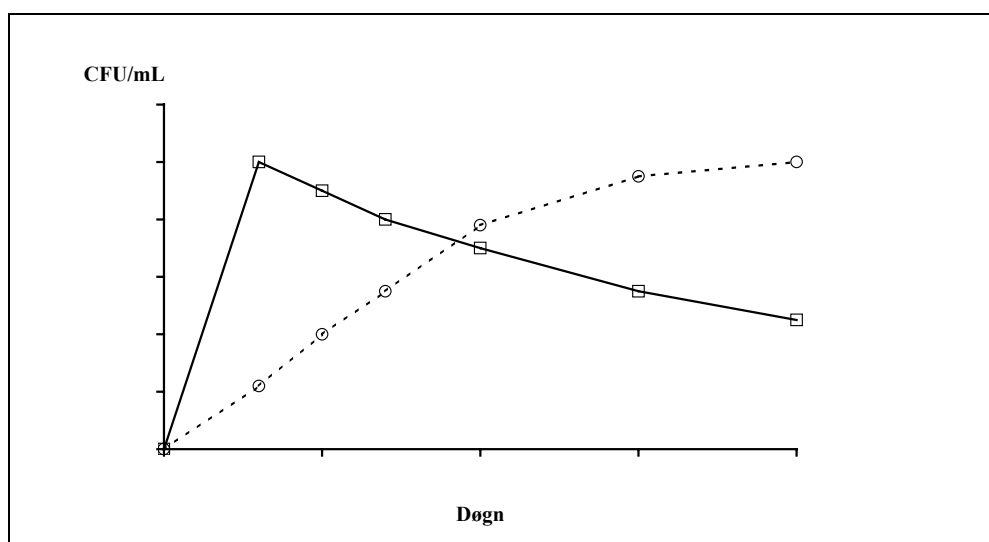
Ud fra  $AOC_{P17}$ -værdierne fra ikke-kontamineret ekstrakter fra de tre serier, blev bestemt et gennemsnit for afgivelsen fra de fem materialer på trods af, at der ikke var triplikate værdier for alle materialer fra én serie (Tabel 17).  $AOC_{P17}$ -værdier for de enkelte ekstrakter blev fratrukket den gennemsnitlige blindværdi for de respektive serier inden beregning. To  $AOC_{P17}$ -værdier for henholdsvis blå og sort PEM var afvigende høje (markeret med parentes i Tabel 17). Disse værdier indikerede en forurening med eksternt kulstof (Kap. 3.3.2), og indgik derfor ikke i beregningen af gennemsnit. Da de enkelte ekstrakter stammede fra forskellige serier (med forskellige blindværdier) kunne en gennemsnitlige  $AOC_{P17}$ -værdi ikke bestemmes som beskrevet i

Kapitel 3, og i stedet blev det aritmetiske gennemsnit bestemt. Der var en tendens til at der blev opnået højere værdier i ekstrakter af PEM og PVC (org.) end i metalstabiliseret PVC, men på grund af variationen mellem ekstrakterne var disse forskelle ikke signifikante. Der blev målt afgivelser på mellem 27 og 41  $\mu\text{g}$  acetat-C/L svarende til en flux på  $3,5\text{-}5,5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}$  acetat-C/d/cm<sup>2</sup>.

Værdierne for de to PEM materialer svarer til, hvad der blev set ved tidligere undersøgelser: Fra undersøgelsen af syv S/V-forhold blev der for blå PEM<sub>(2)</sub> under tilsvarende testforhold ved et S/V-forhold på 0,55 cm<sup>-1</sup> opnået en værdi for afgivelsen på 31  $\mu\text{g}$  acetat-C/L; for sort PEM blev der ved undersøgelsen af sekventielle ekstraktioner (ekstraktion ved 10°C) opnået 34  $\mu\text{g}$  acetat-C/L i det første ekstrakt på trods af kontaminering med en uønsket bakteriestamme.

## 9 Modellering af AOC-data

Ved AOC-metoden fastsættes AOC-værdien ud fra en vækstkurves maksimale værdi. På denne måde vil prøver med vidt forskellige vækstkurveforløb (som skitseret på Figur 24) få tillagt den samme AOC-værdi, blot der er opnået samme maksimale bakterieantal. Der er i projektet (og i forbindelse med andre forsøg udført på IMT) observeret en generel tendens til, at jo højere substratkoncentrationer er, desto tidligere i inkubationsforløbet opnås den maksimale bakteriekoncentration, og desto hurtigere falder vækstkurven igen. Forskelle i vækstkurveforløb kan desuden skyldes, at forskellige substrater ikke er lige biotilgængelige for bakterierne, og således vil blive omsat med forskellig hastighed. Der går således information tabt ved ikke at benytte det fulde vækstkurveforløb til fastlæggelse af AOC-værdien. Inddrages hele vækstkurveforløbet (inklusive decay) vil der formentlig også kunne siges noget om substraternes tilgængelighed, og en mere korrekt AOC-værdi fastlægges. En bedre bestemmelse af AOC-værdien kunne således tænkes opnået, hvis denne fastsættes ud fra en modellering over alle punkter på vækstkurven.



Figur 24: Skitsering af to forskellige mulige vækstkurveforløb ved udførelse af en AOC-bestemmelse.

### 9.1 Modelleringen

En typisk vækstkurve for et batchforsøg kan opdeles i tre faser, nemlig lag-, vækst- og henfaldsfasen. I lagfasen er den bakterielle vækst endnu ikke startet, fordi bakterierne endnu ikke har dannet de nødvendige enzymer. I vækstfasen vokser bakterierne eksponentielt indtil væksten begrænses af en faldende substratkoncentration. Når substratet er opbrugt, begynder bakterierne at dø eller gå over i en hvilefase, hvor de ikke umiddelbart kan vokse på traditionelle medier, dvs. antallet reduceres, hvilket kendetegner henfaldsfasen. Lagfasen for en renkultur varer sjældent mere end nogle få timer, hvilket betyder, at den kan negligeres i forhold til det samlede vækstforløb.

Ved den traditionelle AOC-bestemmelse fastlægges hele vækstforløbet ved løbende kintalsbestemmelser, men det er kun den maksimale

bakteriekoncentration i vækstforløbet, der anvendes til beregning af AOC-værdien. Det kan være svært at opnå en sikker bestemmelse af AOC-værdien, fordi kimtalsbestemmelser generelt er behæftet med væsentlig måleusikkerhed. En modellering over hele datasættet kan reducere usikkerheden i AOC-bestemmelsen, da den enkelte måling indgår med mindre vægt.

Ved modelleringen anvendes den basisviden, der er knyttet til bakteriel vækstkinetik. Således kan tilvæksten af bakterier modelleres som en dynamisk proces, hvor væksten beskrives med et simpelt Monod udtryk, kombineret med henfald. Henfaldet kan antages at være proportionalt med antallet af bakterier. Den samlede ligning for tilvæksten af bakterier bliver således:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{C}{C + K_s} X - k_{\text{henfald}} X$$

Hvor  $X$  er bakteriekoncentrationen,  $C$  er substratkoncentrationen,  $t$  er tiden,  $\mu_{\max}$  er observeret maksimal væksthastighed,  $K_s$  er halvmætningskonstant og  $k_{\text{henfald}}$  er henfaldskonstant.

Fjernelsen af substrat fra vandfasen kan så beskrives som:

$$-\frac{dC}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y} \frac{C}{C + K_s} X$$

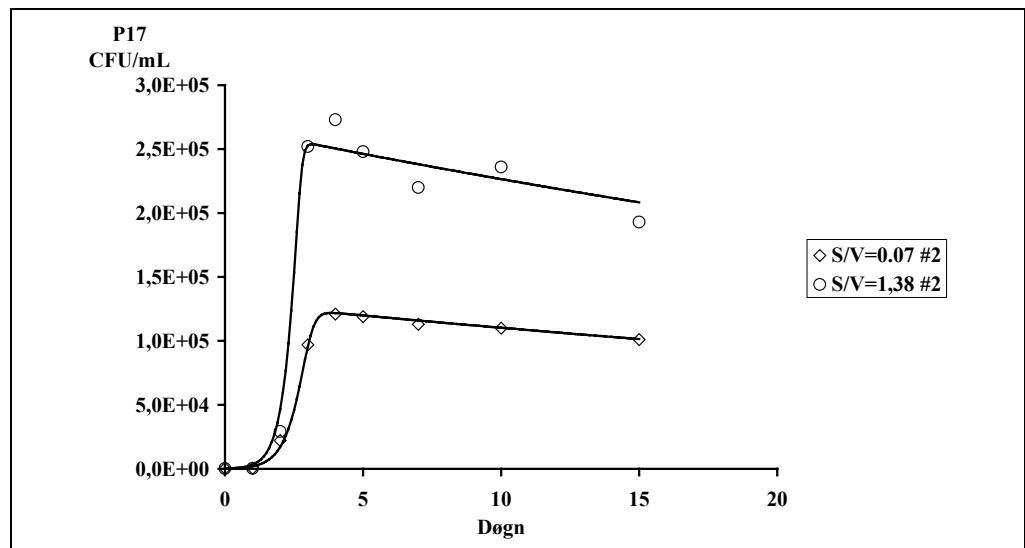
Hvor  $Y$  er udbyttekonstanten, der i dette tilfælde er bestemt ved P17s vækst på acetat.

Modellen blev opstillet i programmet AquaSim version 2.0 /Reichert, 1995/. For prøver (vækstkurver) blev startkoncentrationen af substrat estimeret af modellen, mens startbiomassen for den respektive serie blev bestemt som et gennemsnit af de målte kimal umiddelbart efter podningen. Væksthastighed ( $\mu_{\max}$ ), halvmætningskonstant ( $K_s$ ) og henfaldskonstant ( $k_{\text{henfald}}$ ) blev ved hjælp af modellen bestemt som globale parametre, dvs. fælles for alle vækstforløbene.

## 9.2 Modeleringsresultater

Datasættene fra undersøgelsen af forskellige S/V-forhold og udvalgte materialer var umiddelbart mest velegnede som grundlag for modelleringen, da begge undersøgelser omfattede et stort antal sammenhørende prøver. 20 vækstkurver fra S/V-undersøgelsen (Kapitel 7) og 29 ikke-kontaminerede vækstkurver fra undersøgelsen af fem polymere materialer (Kapitel 8) blev indlæst og anvendt til parameterestimation.

Generelt syntes modellen at give en god beskrivelse af de målte data. To eksempler på modellering af vækstkurver er vist i Figur 25.



Figur 25: Eksempel på modellering af vækstkurver med data fra Kapitel 7.

Resultatet af parameterestimationen for S/V-undersøgelsen er angivet i Tabel 18 sammen med værdierne fra den almindelige AOC. Tilsvarende blev AOC-værdierne fra undersøgelsen af udvalgte materialer estimeret (Tabel 19).

Fra modellerne kan der, udover AOC-værdien, yderligere udtrages information vedrørende bakteriernes vækstkinetik. Således kan væksthastighed, halvmætningskonstant og henfaldskonstant bestemmes direkte ud fra modellen (Tabel 20). Især væksthastighed og halvmætningskonstant kan have interesse i forhold til en vurdering af nedbrydeligheden af de fra plastmaterialerne afgivne stoffer.

S/V-forhold [cm <sup>-1</sup> ]	Aflæst [ug acetat-C/L]	Model	S/V-forhold [cm <sup>-1</sup> ]	Aflæst [ug acetat-C/L]	Model
0,07 #1	28	27	0,55 #1	54	53
0,07 #2	30	30	0,55 #2	52	52
0,07 #3	-	i.m.	0,55 #3	53	50
0,14 #1	37	37	0,69 #1	79	75
0,14 #2	36	35	0,69 #2	78	68
0,14 #3	40	35	0,69 #3	-	i.m.
0,27 #1	59	51	1,38 #1	75	74
0,27 #2	49	45	1,38 #2	77	75
0,27 #3	52	46	1,38 #3	67	63
0,41 #1	37	34	Blind #1	21	22
0,41 #2	45	47	Blind #2	21	18
0,41 #3	46	44	Blind #3	-	i.m.

Tabel 18: AOC<sub>P17</sub>-værdier bestemt ved parameterestimation i AOC-model sammenholdt med værdier fra den almindelige beregning. Data fra undersøgelse af forskellige S/V-forhold. - : Ekstrakter der ikke blevet taget med i beregninger (Bilag H); i.m.: ikke modelleret.

Materiale	Serie 1		Serie 2		Serie 3	
	Aflæst	Model	Aflæst	Model	Aflæst	Model
Blå PEM <sub>(2)</sub> #1	36	32	-	i.m.	64	60
Blå PEM <sub>(2)</sub> #2	42	36	-	i.m.	42	35
Blå PEM <sub>(2)</sub> #3	67	62	-	i.m.	41	36
Sort PEM #1	-	i.m.	46	36	63	62
Sort PEM #2	-	i.m.	43	35	-	i.m.
Sort PEM #3	65	60	92	76	-	i.m.
PVC(Zn/Ca) #1	-	i.m.	-	i.m.	54	47
PVC(Zn/Ca) #2	-	i.m.	-	i.m.	-	i.m.
PVC(Zn/Ca) #3	-	i.m.	-	i.m.	-	i.m.
PVC(Pb) #1	-	i.m.	39	32	-	i.m.
PVC(Pb) #2	-	i.m.	39	35	46	42
PVC(Pb) #3	-	i.m.	-	i.m.	52	48
PVC(Org.) #1	48	43	-	i.m.	-	i.m.
PVC(Org.) #2	49	46	-	i.m.	-	i.m.
PVC(Org.) #3	39	37	40	39	-	i.m.
Blind #1	9	8	10	11	28	23
Blind #2	13	13	14	14	24	23
Blind #3	7	7	8	9	21	18

Tabel 19: AOC<sub>P17</sub>-værdier bestemt ved parameterestimation i AOC-model sammenholdt med værdier fra den almindelige beregning. Data fra undersøgelse af udvalgte materialer. - : Ekstrakter der ikke blevet taget med i beregninger (Bilag H); i.m.: ikke modellet.

Undersøgelse	$\mu_{\max}$ [d <sup>-1</sup> ]	$K_s$ [µg acetat-C/L]	$k_{\text{henfald}}$ [d <sup>-1</sup> ]
S/V-forhold	3,4 ± 0,2	17 ± 3	0,0049 ± 0,0007
Udvalgte materialer	5,1 ± 0,4	41 ± 8	0,0028 ± 0,0027

Tabel 20: Globale parametre bestemt ved parameterestimation i AOC-model.

På trods af det næringsfattige miljø voksede bakterierne i forsøget med overraskende høj hastighed. Bakteriernes estimerede væksthastighed var sammenlignelige med værdier observeret i aktiv slam anlæg, derimod var halvmætningskonstant og henfaldskonstant væsentligt lavere /Henze et al. 1997/.

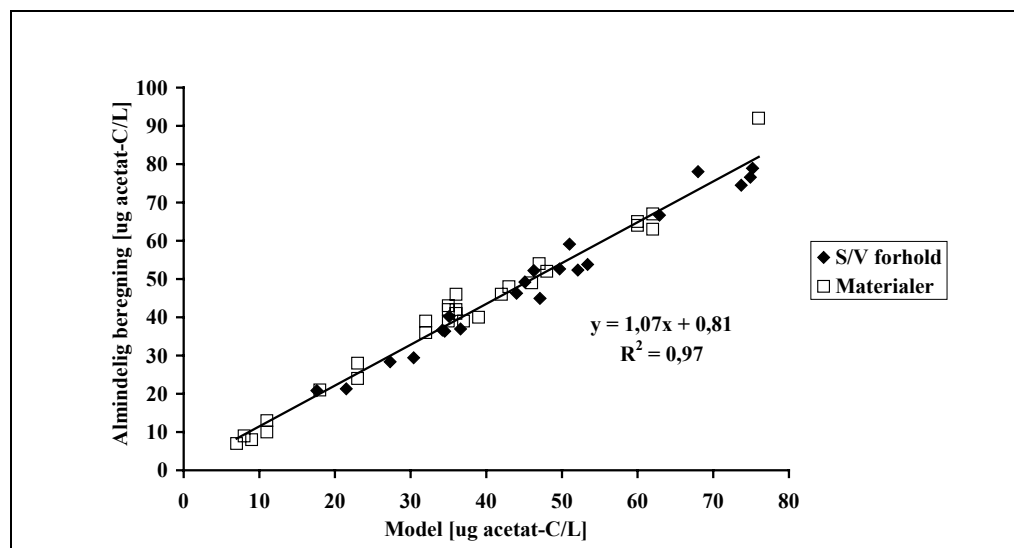
I Monod-modellen er halvmætningskonstanten og væksthastigheden stærkt korrelerede, hvorfor der stilles store krav til datamaterialet. Anvendelsen af væksthastighed og halvmætningskonstant som globale parametre forudsætter, at substratomsætningen er ens i de målte vækstforløb, hvilket i teorien kun er tilfældet, hvis der er tale om det samme stof. Generelt bør de globale parametre kun anvendes for nært beslægtede stoffer, hvilket imidlertid kan være vanskeligt at opnå i praksis. De globale variable kan derfor ikke opfattes som et udtryk for P17s generelle vækstkinetik, men er kun gældende for det specielle tilfælde. Mere generelle udtryk for de globale parametre kræver, at forsøgene udføres med den samme type substrat ved forskellige



koncentrationer, som i tilfældet med undersøgelse af forskellige S/V-forhold eller ved fremstilling af AOC-standardkurver på kendte kulstofkilder.

Af modelleringen fremgik det tydeligt at kurvetilpasningen til datasættet fra S/V-forholdsundersøgelsen var væsentligt bedre end undersøgelsen med udvalgte materialer. Dette blev til dels afspejlet af at værdien for halvmætningskonstanten i undersøgelsen af udvalgte materialer var høj i forhold til de undersøgte AOC-koncentrationer (1. ordens vækst), hvilket antyder at Monod modellen var ikke var velegnet til beskrivelse af vækstforløbene.

Sammenlignes de to beregningsmetoder ses en afvigelse på ca. 7%, idet modelleringen giver systematisk lavere AOC-værdier (Figur 26). Afvigelsen afspejler til dels, at man ved at benytte ekstremværdier i den almindelige beregning af AOC begår en systematisk regnefejl. En målefejl, der giver et større tal vil blive vægtet højere i forhold til en målefejl, der giver et mindre tal. Således opstår den paradoksale situation, at jo flere målinger man foretager, jo større er sandsynligheden for en høj AOC-værdi.



Figur 26: Sammenligning mellem beregningsmetoder for AOC-værdier.

Målefrekvensen bør generelt tilpasses den type af information, der skal udtrages af kurveforløbene. Ønskes f.eks. en god bestemmelse af bakteriernes vækstkinetik, er det vigtigt at fokusere prøvetagningen omkring den indledende vækstfase. Desuden bør der så vidt muligt udføres forsøg med forskellige startkoncentrationer af substrat.

Samlet set vil en modellering mindske betydningen af usikkerheden på et enkelt punkt og den vil desuden kunne give oplysninger om væksthastigheden og dermed tilgængeligheden af substratet. Dette giver mulighed for at foretage en objektiv analyse af data fra AOC-bestemmelsen. For at kunne anvende en modellering til fastlæggelse af AOC-værdier er det dog nødvendigt i langt større omfang at undersøge modelparametrenes afhængighed af substratkoncentration og substrattype.



# 10 Samlet diskussion

Igennem de indledende undersøgelser til udviklingen af en metode blev det valgt at fastlægge polymere materialers eftervækstpotentiale ved en to-trins-procedure:

1. Steril ekstraktion af materialet
2. AOC-bestemmelse på det færdige ekstrakt

Valget af en steril ekstraktion af materialerne giver mulighed for at teste materialerne under forhold, der ikke ville tillade vækst af testbakterien. Samtidig giver det mulighed for direkte sammenligning af AOC-værdier imellem ekstrakter, da AOC-bestemmelsen altid ved være udført på samme vis, uafhængig af ekstraktionsforhold.

Materialet blev ekstraheret ved nedsenkning i testvandet frem for opfyldning af rørlængder, da dette gav mulighed for at undersøge andre komponenter end rør, såsom fittings, der kan have stor betydning i f.eks. vandhaner. Der er dog to primære ulemper ved at ekstrahere materialerne på denne måde: Der kan kun undersøges komponenter, der er ens på inder- og yderside, og materialet skal udskæres, hvilket medfører at både naturlige overflader og snitflader er i kontakt med vandfasen. Snitfladerne har ikke umiddelbart betydning for afgivelsen, men det er en faktor, der kan give anledning til variation, da den procentdel snitflader udgør af det totale overfladeareal afhænger af det anvendte rørs dimensioner (Tabel 21). Det bør dog så vidt muligt tilstræbes, at snitfladerne udgøre så lille en procentdel af overfladearealet som muligt, da snitfladerne alt andet lige altid vil fremstå mere ru end de naturlige overflader. Snitflader kan undgås ved at ekstrahere rørmaterialer ved opfyldning af rørlængder, der samtidig vil give mulighed for at undersøge rør, som ikke er ens på inder- og yderside. En sådan ekstraktionsform vil dog i praksis være problematisk at udføre sterilt. Et mål for eftervækstpotentialet for rør med forskellige inder- og yderside vil kunne fastlægges ved den valgte metode ved en undersøgelse af rør fremstillet af indersidematerialet.

Materiale	Diameter		% snitflader ved $S/V = 0,5 \text{ cm}^{-1}$
	Ydre	Indre	
Blå PEM <sub>(1)</sub>	32	29	7
Blå PEM <sub>(2)</sub>	20	16	5
Sort PEM	20	16	5
PVC(Pb)	90	81,4	17
PVC(Org.)	110	101	23
PVC(Zn/Ca)	110	99	19

Tabel 21: Procentdel snitflader udgør af totale overfladeareal ved et S/V-forhold på  $0,5 \text{ cm}^{-1}$  for de i projektet undersøgte fem polymere rørmaterialer.

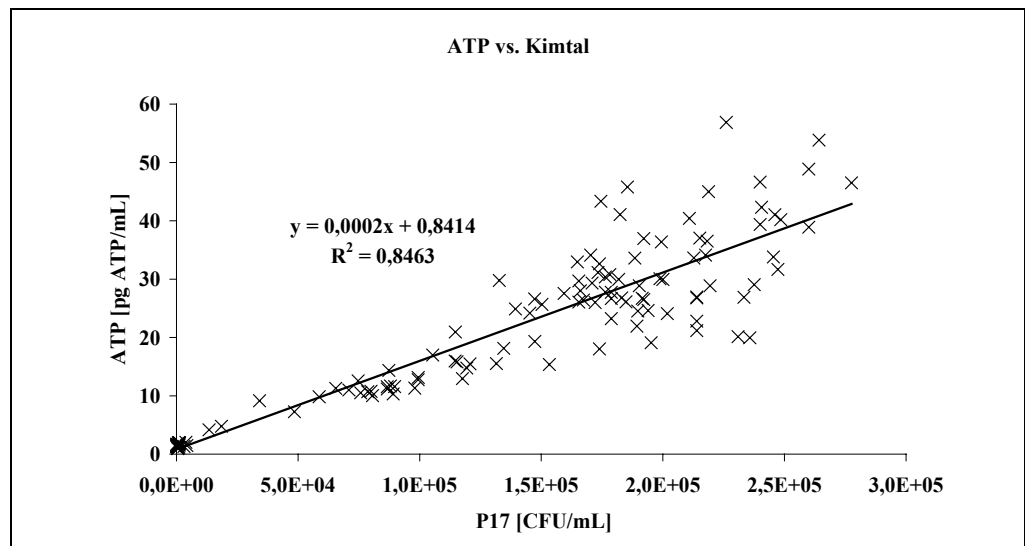
Den væsentligste svaghed ved kombinationen af ekstraktion og AOC-bestemmelse er nødvendigheden af, at ekstraktionen forløber sterilt. I dette projekt har der været en del problemer med at inaktivere testvandets og/eller postevandets naturlige bakteriepopulation. Grunden til at problemerne først

opstod undervejs i projektets arbejdet kan formentlig tilskrives ændringer i råvandet, da Lyngby vandværk pumper fra skiftende borer. I dette projekt kunne problemet med overlevelse af uønskede bakterier formentlig være løst ved at skifte vandtype, hvilket dog ville have medført praktiske besværligheder. Undervejs i arbejdet blev der i nogle tilfælde oplevet relativt høje blindværdier (ekstraktionen af blå PEM<sub>(2)</sub> i S/V-undersøgelsen, Kapitel 7 og serie 3 i undersøgelsen af fem polymere materialer, Kapitel 8), hvilket formentlig også kan tilskrives variationer i driften (testvandet kan f.eks. være udtaget lige efter et returskyl). De relativt høje blindværdier har dog ikke haft indflydelse på afgivelsen fra materialerne, hvilket kan ses ved de sammenlignelige værdier fra ikke-kontaminerede ekstrakter mellem serie 1, 2 og 3 i undersøgelsen af fem polymere materialer (jævnfør Tabel 17 i Kapitel 8).

Ved at undersøge afgivelsen fra et polymert materiale, er der tre primære kvalitetskriterier, der skal overvejes ved kvalitetsvurdering af et ekstrakt:

- Har ekstraktet været kontamineret med uønskede bakterier under ekstraktionen (pasteurisering ikke tilstrækkelig effektiv)
- Er ekstraktet blevet kontamineret med uønskede bakterier under kimtalsbestemmelserne
- Er ekstraktet blevet kontamineret med eksternt organisk kulstof

I undersøgelsen af fem polymere materialer (Kapitel 8) blev ATP-måling anvendt til at afgøre, om ekstrakterne havde været kontamineret under ekstraktionen. ATP-måling vil således kunne anvendes som kvalitetsparameter til kontrol af, om ekstraktet er sterilt inden podningen med P17 dag 0. ATP-målinger i forbindelse med kimtalsbestemmelser gav i undersøgelsen af fem polymere materialer (serie 3) en god overensstemmelse imellem vækstkurver udtrykt ved AOC og ATP (jævnfør Figur 23). Optegnes ATP som funktion af CFU P17 (for de ikke-kontaminerede ekstrakter fra serie 3), ses en klar tendens til en lineær sammenhæng, der angiver den enkelte P17-bakteries ATP-indhold til 0,0002 pg ATP/CFU ( $R^2=0,85$ ). ATP-målinger vil således også kunne anvendes som kontrol under selve AOC-bestemmelsen, ved at sammenligne CFU P17-værdier med sammenhørende ATP-værdier. Hvis ATP-værdien er højere end det forventede niveau, er ekstraktet kontamineret med uønskede bakterier, som ikke detekteres ved kimtalsbestemmelserne på R<sub>2</sub>A-agar. Hvis et enkelt ekstrakt afviger med for høj AOC-værdi i forhold til de øvrige replikater, må det antages, at det pågældende ekstraktet er blevet kontamineret med organisk kulstof, som ikke kan tilskrives materialet.



Figur 27: ATP som funktion af CFU P17 baseret på data fra ikke-kontamineret ekstrakter af fem polymere materialer og tilhørende blindprøver fra serie 3. Ekstraktionerne blev udført ved 20°C over 15 døgn med omrystning, mens væksten af P17 foregik ved 15°C.

ATP-målinger vil eventuelt helt kunne erstatte kimtalsbestemmelser ved bestemmelse af afgivelse fra polymere materialer, hvorved stort set vilkårlige bakteriestammer (renkulturer) eller en naturlig population (blandingskulturer) kunne anvendes som standard. Ved undersøgelsen af ekstraktionsmetoder (Kapitel 4) og undersøgelsen af desinfektion (Kapitel 5) blev der anvendt en naturlig bakteriepopulation, som ved kimtalsbestemmelserne gav langt mindre forskel på ekstrakter og blindprøver end ved anvendelse af P17. Dette kan formentlig tilskrives, at en meget lille andel af bakterierne kunne vokse på  $R_2A$ -agar eller ved de anvendte inkubationsforhold. Ved måling af ATP vil der ved anvendelse af en naturlig population formodentlig være langt større forskel på ekstrakter og blindprøver, da alle bakterier vil blive registreret. Et problem ved at anvende ATP som parameter vil dog være, at cellerne kan mobilisere deres ATP-indhold som reaktion på ændringer i vækstforhold og vækststadium /Atlas et al., 1993/. Svært-nedbrydelige stoffer kunne således resultere i et andet ATP-indhold i cellen, end hvis denne udsættes for let-nedbrydelige stoffer.

Ud fra de udførte undersøgelser blev der ikke fundet en simpel lineær sammenhæng imellem afgivelsen udtrykt som  $AOC_{P17}$ -værdi og S/V-forhold (jævnfør **Tabel 22**). Der var en tendens til øget  $AOC_{P17}$ -værdi i vandfasen jo større mængde materiale, der blev ekstraheret, indtil et vist S/V-forhold, hvorover der ikke blev afgivet væsentlig mere til vandfasen. Ved hvilket S/V-forhold denne hændelse indtræder er formentlig en kombination af materiale, ekstraktionstemperatur og af, om der er omrystning under ekstraktionen. Fluxen viste en tendens til omvendt proportionalitet imellem afgivelsen og S/V-forhold, hvilket ligeledes indikerer, en begrænsning af afgivelsen fra materialet med stigende S/V-forhold. Mekanismen omkring afgivelsen er stadig uklar, da forlænget ekstraktionstid og omrystning gav øget afgivelse ved S/V-forhold, hvor der ikke var forskel i afgivelsen som følge af S/V-forhold. Da en observeret afgivelse ikke direkte kan skaleres med S/V-forhold, kompliceres tolkningen af testresultater.

Materiale	Temp. [°C]	Omrystning	Ekstraktionstid [døgn]	S/V-forhold [cm <sup>-1</sup> ]	AOC <sub>P17</sub> [µg acetat-C/L]	Flux [×10 <sup>-3</sup> µg acetat-C/d/cm <sup>2</sup> ]
PEM <sub>(1)</sub>	10	Uden	9	0,5	24	5,2
				1,0	29	3,2
			20	0,5	56	5,6
				1,0	50	2,5
Sort PEM	10	Uden	15	0,5	29*	3,8*
				1,0	30*	2,0*
		Med	15	0,5	35*	4,7*
				1,0	45*	3,0*
Blå PEM <sub>(2)</sub>	20	Med	5	0,14	23	66,9
				0,69	31	9,0
			15	0,07	8	8,5
				0,14	14	7,0
				0,27	29	7,9
				0,41	20	3,4
				0,55	31	3,8
				0,69	57	5,6
				1,38	50	2,4
Blå PEM <sub>(2)</sub>	20	Med	15	0,5	33	4,4
Sort PEM	20	Med	15	0,5	41	5,5
PVC(Zn/Ca)	20	Med	15	0,5	26	3,5
PVC(Pb)	20	Med	15	0,5	27	3,6
PVC(Org.)	20	Med	15	0,5	34	4,5

Tabel 22: Testforhold og opnåede afgivelser (fratrukket blindværdi) for de udførte undersøgelser med P17. \*Ekstrakter var kontamineret med uønskede bakterier (benævnt NN).

I **Tabel 22** er resultater fra de udførte undersøgelser med P17 opsummeret. I alle undersøgelserne blev der opnået en signifikant afgivelse fra alle de undersøgte materialer. Med S/V-forhold i intervallet 0,07-1,38 cm<sup>-1</sup> lå AOC<sub>P17</sub>-afgivelserne for de undersøgte materialer i intervallet 8-57 µg acetat-C/L. Disse værdier skal vurderes ud fra, at der har været anvendt betydeligt længere opholdstider under ekstraktionen af materialerne, end der normalt vil forekomme i distributionssystemet, og at ekstraktionerne er foretaget i stillestående vand (i nogle tilfælde med lettere omrystning) i modsætning til et (sædvanligvis) kontinuert, om end varierende over døgnet, flow i distributionssystemet. Ligeledes er ekstraktionerne udført sterilt, hvorved der ikke er har været kontakt mellem bakterier og materialer (ingen biofilmdannelse på materialeoverfladerne). I et distributionssystem vil den primære del af biomassen findes som biofilm på rørindersiderne. Det kan ikke afvises, at bakterier i en sådan biofilm vil kunne 'trække' substrat ud af materialerne, og at en sådan aktiv afgivelse vil have større betydning end den passive afgivelse i de udførte ekstraktionstest. Ligeledes vil bakterier i en

biofilm blive udsat for en langt stejlere koncentrationsgradient end bakterierne i vandfasen.

Med disse forbehold i mente, kan der ud fra data i **Tabel 22** (der ses bort fra 5 døgn ekstraktionerne) opstilles en simplificeret vurdering af, om bidraget fra polymere materialerne vil have betydning ude i distributionsnettet. For at forenkle beregningerne benyttes antagelsen, at afgivelsen foregår kontinuert over tid.

Distributionsnettet kan efter indre rørdiameter opdeles i hovedledninger 305-1200 mm, forsyningsledninger 50-292 mm /Københavns vand, 1998/ og i stikledninger samt husinstallationer, der går ned til 7 mm. S/V-forholdene er i hovedledningerne 0,03-0,13  $\text{cm}^{-1}$ , i forsyningsledningerne 0,14-0,80  $\text{cm}^{-1}$  og i stikledninger/husinstallationer 0,80-5,7  $\text{cm}^{-1}$  (opsummeret i Tabel 23). Sædvanligvis vil opholdstiden i byinstallationer ikke overskride et par dage, mens der ved lange forsyningsledninger til landområder kan være opholdstider op til 2 uger.

Rørtype	Diameter [mm]	S/V-forhold [ $\text{cm}^{-1}$ ]
Hovedledninger	305-1200	0,03-0,13
Forsyningsledninger	50-292	0,14-0,80
Stikledninger/husinstallationer	7-50	0,80-5,7

Tabel 23: Generelle S/V-forhold i distributionssystemet.

Derved vil bidraget fra polymere materialer i hovedledningerne kun bidrage med under 1  $\mu\text{g}$  acetat-C/L/d til vandfasen. I forsyningsledningerne vil AOC-bidraget til vandfasen være i en størrelsesorden af 1-3  $\mu\text{g}$  acetat-C/L/d, mens det tilsvarende bidrag i stikledninger/husinstallationer vil være i en størrelsesorden af 3  $\mu\text{g}$  acetat-C/L/d. Disse værdier skal sammenholdes med generelle AOC-niveauer i dansk drikkevand.

I en undersøgelse, der bl.a. omfattede bestemmelse af AOC-niveauer i dansk drikkevand, blev der for 10 danske vandværker fundet værdierne angivet i Tabel 24. Det færdigbehandlede vands AOC-værdier var grupperet med værdier dels under 10  $\mu\text{g}$  acetat-C/L, og dels i et interval imellem 20 og 40  $\mu\text{g}$  acetat-C/L. Sammenholdt med de anslåede niveauerne fra ovenstående afsnit vil afgivelser fra rørmaterialerne have mindre betydning i forbindelse med vand fra den sidste kategori, og vil ved normal drift hellere ikke give direkte anledning til problemer i vand fra den første kategori. Ved lange forsyningsledninger med opholdstider på f.eks. 4 døgn, vil der dog være risiko for, at vandets AOC-indhold kan fordobles under vejen til forbrugeren:

$$\text{Afgivelse } \text{AOC}_{\text{p17}} = 4 \text{ d} \times 2 \mu\text{g acetat C/L/d} = 8 \mu\text{g acetat C/L}$$

Ligeledes vil vand, der får lov at henstå i husinstallationerne f.eks. hen over en weekend kunne opnå et betydeligt  $\text{AOC}_{\text{p17}}$ -bidrag:

$$\text{Afgivelse } \text{AOC}_{\text{p17}} = 2 \text{ d} \times 3 \mu\text{g acetat C/L/d} = 6 \mu\text{g acetat C/L}$$

6-8  $\mu\text{g}$  acetat-C/L svarer til  $2,5-3,3 \cdot 10^4$  CFUP17/mL. Til sammenligning indeholder frisktproduceret vand fra Lyngby vandværk i størrelsesordenen 200 CFU/mL bestemt som kimal på  $R_2A$ -agar.

Ved lange forsyningsledninger kan vandets naturlige indhold af AOC være forbrugt undervejs til forbrugeren, og et AOC-bidrag fra rørmaterialet i husinstallationen vil således få en langt større betydning for vandkvaliteten.

Vandværk	AOC [µg acetat-C/L]	95% konfidensinterval
Islevbro	3,7	± 0,8
Thorsbro	4	± 2
Haraldsbro	4	± 1
Slangerup	5	± 2
Tisvilde	5,0	± 0,2
Sjælsø	6	± 2
Ullerup	20	± 6
Kisserup	27	± 5
Rørvig	39	± 9

Tabel 24: AOC-indhold i færdigbehandlet drikkevand fra 10 danske vandværker /Jørgensen et al., 2000/.



# 11 Konklusion

Ekstraktion af polymere materialer uden tilstedeværelse af aktive bakterier viste sig at være en egnet ekstraktionsmetode, som giver mulighed for at vælge ekstraktionsforholdene uden hensyntagen til bakteriers vækstforhold (høje temperaturer, variation i pH, høje klorkoncentrationer). Ekstraktionsmetoden muliggør desuden, at der også kan udføres f.eks. GC-MS eller toksikologiske undersøgelser af ekstraktet. For at kunne ekstrahere uden aktive bakterier blev materialet desinficeret inden ekstraktionen. I det eksperimentelle arbejde blev der afprøvet to desinfektionsmetoder; pasteurisering og kloring. Der blev ikke set nogen forskel i afgivelsen fra materialerne som følge af desinfektionsmetode, og data gav ikke indikation af, at materialerne blev påvirket af desinfektionen.

Ved den valgte metode kan det dog være vanskeligt at sikre sterile forhold og der er en risiko for kontaminering af ekstrakterne organisk kulstof. Uønskede bakterier kan overleve pasteuriseringen og ekstrakterne kan blive kontamineret med uønskede bakterier i forbindelse med optagningen af teststykker og efterfølgende podning. Ikke alle de uønskede bakterier detekteres ved kimtalsbestemmelserne i forbindelse med AOC-bestemmelsen. Dette skyldes dels, at pladernes inkubationstid er for kort til, at disse bakterierne når at danne synlige kolonier, og dels at disse bakterier ikke kan danne kolonier på R<sub>2</sub>A-agar. Undersøgelser viste, at måling af ATP i forbindelse med kimtalsbestemmelserne er en velegnet metode til at afgøre, om et ekstrakt er blevet kontamineret med uønskede bakterier under ekstraktionen. ATP-målinger vil eventuelt helt kunne erstatte kimtalsbestemmelser ved bestemmelse af afgivelsen fra et polymert materialer, men vil under alle omstændigheder være et godt supplement som kvalitetssikring.

Anvendelse af renkulturer til måling på ekstraktet er at foretrække frem for en naturlig bakteriepopulation ud fra et standardiseringssynspunkt. De udførte undersøgelser viste desuden, at der ved kimtalsbestemmelser på R<sub>2</sub>A-agar var mindre forskel imellem prøver og blindprøver ved anvendelse af en naturlig bakteriepopulation end ved anvendelse af de anvendte renkulturer (P17 og NOX).

De indledende undersøgelser med P17 og NOX viste, at de stoffer, der afgives fra de undersøgte materialer, kun har indflydelse på antallet af P17. NOX giver således blot anledning til kolonier, der mindsker præcision af bestemmelsen af P17 ved optællingen, hvorfor bestemmelserne blev udført med P17 alene.

Ved de udførte korttidstest var der en tydelig afgivelse af biotilgængeligt organisk stof fra de undersøgte polymere materialer. Undersøgelser med blåt PEM materiale viste en signifikant afgivelse selv efter kun 5 døgn ekstraktion ved 20°C. Undersøgelserne viste, at der ikke var tale om en kort initial afgivelse, men en afgivelsen over længere tid. I en undersøgelse med sort PEM materiale blev der observeret en konstant afgivelse over 60 døgn ekstraktion. Der blev ikke fundet en entydig sammenhæng imellem afgivelsen og S/V-forhold. Der blev set en tendens til stigende AOC<sub>P17</sub>-koncentration i vandfasen

med stigende S/V-forhold indtil et vist S/V-forhold, hvor der ikke blev afgivet væsentligt mere til vandfasen. Omregnet til flux var afgivelsen omvendt proportionalt med anvendte S/V-forhold.

Afgivelserne fra de fem undersøgte polymere materialer var af samme størrelsesorden:  $3,5-5,5 \times 10^{-3} \mu\text{g acetat-C/d/cm}^2$ , og vil kunne have betydning for den mikrobiologiske kvalitet af drikkevand, såfremt opholdstiden i forsyningsrør og husinstallationer overskrider mere end et par dage.

# 12 Ordliste

<i>Additiver</i>	Stoffer der tilsættes et materiale for at forbedre materialets egenskaber eller lette/muliggøre fremstillingsprocessen.
<i>Aktive bakterier</i>	Levende bakterier, i modsætning til bakterier der er inaktiveret (slået ihjel) ved desinfektion.
<i>AOC</i>	Assimilerbart Organisk Carbon. Den fraktion af organisk kulstof, der kan optages og udnyttes af bakterier.
<i>ATP</i>	Adosin triphosphat, tjener som energilager i levende celler.
<i>Autoklaving</i>	Desinfektionsmetode baseret på opvarmning i trykbeholder ved 120°C i 15 minutter.
<i>Biofilm</i>	Et lag af organisk materiale med mikroorganismer som f. eks. vokser på indersiden af vandrør.
<i>CFU</i>	Colony Forming Unit, Engelsk udtryk for kimtal.
<i>Desinfektion</i>	Proces der slår bakterier ihjel. De døde bakterier bliver ikke fjernet.
<i>E.O.M.</i>	Error Of Mean - den observerede spredning på kimtal (anvendes for diskrete værdier).
<i>Ekstraktion</i>	Proces hvor stoffer fra et materiale kan bliver afgivet til vandfasen i kontakt med materialet.
<i>Flux</i>	Massestrøm - afgivelse fra et materiale angivet i masse per overfladeenhed per tidsenhed.
<i>HPC</i>	Heterotrophic Plate Count (Heterotrofe kimtal).
<i>Inkubering</i>	Dyrkning under definerede, kontrollerede forhold.
<i>Kimtal</i>	Antal af mikroorganismer der danner kolonier ved dyrkning. Antallet af fremkomne kolonier afhænger af dyrkningsforholdene (tid og temperatur) og det anvendte medie.
<i>Medie</i>	Næringsopløsning bakterier dyrkes på - er oftest gjort fast ved tilsætning af agar.
<i>NOX</i>	Aquaspirillum species, stamme NOX.
<i>P17</i>	Pseudonomas fluorescens, stamme P17.
<i>Patogener</i>	Sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

<i>PE</i>	Polyethylen.
<i>PEM</i>	PE - medium density. Findes endvidere som high density (PEH) og low density (PEL).
<i>PEX</i>	Krydsbundet PE.
<i>PVC</i>	Polyvinylchlorid.
<i>R<sub>2</sub>A-agar</i>	Agarmedie med en sammensætning der er specielt tilpasset de næringsfattige forhold i drikkevand.
<i>S/V-forhold</i>	Forhold imellem materialeoverflade (surface) og vandvolumen (volume) i kontakt med materiale - udtrykt i $\text{cm}^2/\text{cm}^3 = \text{cm}^{-1}$ .
<i>Teststykker</i>	Materiale udskåret i passende stykker, der bruges til undersøgelse af materialet.
<i>Testvand</i>	Vand der anvendes til ekstraktion ved undersøgelse af materialer.

## 13 Referencer

Aminot, A.; Kerouel, R., 1998, *Pasteurization as an alternative method for preservation of nitrate and nitrite in seawater samples*, Marine Chemistry, vol.61:3-4:pp. 203-208

Atlas, R. M.; Bartha R., 1993, *Microbial ecology - fundamentals and application*, 3rd edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Bellen, E.G.; Abrishami, S.H.; Colucci, P.M.; Tremel; C.J., 1993, *Methods for assessing the biological growth support potential of water contact materials*, AWWA Research Foundation & American Water Works Association

Boe-Hansen, R., 1998a, Personlig kommentar

Boe-Hansen, R., 1998b, Upublicerede data

CEN, 1993, *Note on preliminary results of interlaboratory trial*, CEN TC164 WG3 AHG3

Corfitzen, C.B., 1999, *Eftervækstpotentiale for polymere materialer anvendt i vandforsyningen - Udvikling af metode*, Eksamensprojekt ved Institut for Miljøteknologi, Danmarks Tekniske Universitet

Coulson, H.S., 1972, *Polymer types and additives*, Plasticisers, stabilisers and fillers (P.D. Ritchie, editor) London ILIFFE books Ltd.

DS/EN 852-1, 1997, *Plastrørsystemer til transport af drikkevand - Vurdering af migration - Del 1: Bestemmelse af plastrørs migrationsværdier*, Dansk Standard

DFV vejledning, 1995 nr. 10, *Planlægning af vandledningers fornyelse*

DVF vejledning, 1998 nr. 17, *Indledende rapport om vandkvalitet i ledningsnet*

Escobar, I.C.; Randall, A.A., 2000, *Sample storage impact on the assimilable organic carbon (AOC) bioassay*, Water Research vol. 34:5:pp. 1680-1686

Gill, C.O.; Badoni, M., 1997, *The hygienic and organoleptic qualities of ground beef prepared from manufacturing beef pasteurized by immersion in hot water*, Meat Science, vol. 46:1:pp. 67-75

Gill, C.O.; Jones, T.; Badoni, M., 1998, *The effect of hot water pasteurizing treatments on the microbiological conditions and appearances of pig and sheep carcasses*, Food Research International, vol. 31:4:pp. 273-278

Hem, L. J.; Norgaard, E.; Efraimsen, H., 1997, *Begroing i drikkevannsledninger*, Norsk institutt for vannforskning (NIVA)

Henze, M.; Harremoës, P.; Jansen, J.I.C.; Arven, E., 1995, *Wastewater treatment*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

- Jørgensen, C.; Albrechtsen, H-J.; Arvin, E.; Corfitzen, C.B., 2002, *Mikrobiel karakteristisk og eftervækst i drikkevand*, Miljøstyrelsen - Programmet til sikring og forbedring af drikkevandskvaliteten
- Kotz, S.; Johnson, N.L.; Read, C.B., 1982, *Encyclopedia of statistical sciences*, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Københavns vand, 1998, *Årsberetning 1998*
- Lorenzen, H., 1993, *Ledningsanalyse i Odense*, Vandteknik nr. 9:pp.456-464
- Lyngby-Tårnbæk Kommune, 2000 - Drikkevandsanalyse
- Macia, L., 1974, *The role of additives in plastics*, Edward Arnold (Publishers) Ltd.
- Niemelä, S., 1983, *Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations*, Nordic committee on food analysis, Report no. 1, 2<sup>nd</sup> edition
- prEN, 1998, *Methods for determining the potential of materials to influence the microbiological quality of drinking water*, Draft prENV, WRC
- Reasoner, D.J.; Geldreich, E.E., 1985, *A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from portable water*, Applied and Environmental Microbiology vol.49:1:pp. 1-7
- Reichart, P., 1994, *AQUASIM - a tool for simulation and data analysis of aquatic systems*, Water Science and Technology vol. 30:2:pp.
- Schegel, H.G., 1986, *General microbiology*, sixth edition, Cambridge University Press
- Standard methods, 1998, Standard Methods for the examination of water and waste water. 20<sup>th</sup> edition. Assimilable organic carbon. APHA. Washington DC
- van der Kooij, D., 1990, *Assimilable organic carbon (AOC) in drinking water*, Drinking water microbiology pp. 57-87 (G.A. McFeters, editor), Brock/Springer series in contemporary bioscience, Springer-Verlag, New York, Berlin
- van der Kooij, D.; Veenendaal, H.R., 1995, *Determination of the concentration of easily assimilable organic carbon (AOC) in drinking water with growth measurements using pure bacterial cultures. The AOC manual*, The Netherlands Water Works Association (VEWIN).
- van der Kooij, D.; Visser, A.; Hijnen, W.A.M., 1982, *Determining the concentration of easily assimilable carbon in drinking water*, Journal of American Water Works Association, vol.74:10:pp. 540-545

Ward, A.; Stensel, H.R.; Ferguson, J.F.; Ma, G.; Hummel, S., 1999, *Preventing growth of pathogens in pasteurized digester solids*, Water Environment Research, vol.71:2:pp.176-182

ÖKI, 2000, *Development of a method for the assesement of microbial growth on pipes for drinking water supply*, Österreichisches Kunststoffinstitut.





## Materiale oversigt

I det eksperimentelle arbejde blev der anvendt materialer tilsendt direkte fra danske rør-producenter (med undtagelse af PEX-røret). I Tabel A-1 er materialerne angivet med de dimensioner, der blev anvendt i projektet - materialerne B - F er godkendt til brug i drikkevandsforsyning herhjemme. I nogle tilfælde var det nødvendigt at skærer rørstykkerne op på langs, for at de kunne gå i testflaskerne.

Materiale	Diameter [mm]		Rørmængde til S/V-forhold på 0,5 cm <sup>-1</sup> med 200 mL testvand
	Ydre	Indre	
A Hvid PEX	12	7	3 stk. á 5,3 cm
B Blå PEM (1)	32	29	1 stk. á 4,8 cm delt på langs i tre dele
C Blå PEM (2)	20	16	2 stk. á 4,2 cm
D Sort PEM	20	16	2 stk. á 4,2 cm
E Lysegrå PVC med bly stabilisatorer	90	81,4	1 stk. á 1,3 cm delt på langs i 4 dele
F Mørkegrå PVC (RAL 7011) med calcium/zink stabilisatorer	110	101	1 stk. á 2,4 cm delt på langs i 4 dele - heraf anvendes 2 dele
G Ufarvet PVC med organiske stabilisatorer (prøvekørsel)	110	99	1 stk. á 2,3 cm delt på langs i fire dele - heraf anvendes 2 dele

Tabel A-1: Materialer anvendt i projektets eksperimentelle arbejde.



## R<sub>2</sub>A-agar

R<sub>2</sub>A er et lavsubstrat medie, hvilket gør det velegnet til bestemmelse af kimental fra oligotrofe miljøer /Reasoner et al., 1985/. R<sub>2</sub>A kan indkøbes som et færdigt produkt, der blot skal opløses i destilleret vand efter anvisningen. Fra Difco vil 1 L færdig agar til eksempel indeholde:

Bacto Yeast Extract	0,5 g
Bacto Protose Pepton No. 3	0,5 g
Bacto Casamino Acids	0,5 g
Bacto Dextose	0,5 g
Soluble Starch	0,5 g
Sodium Pyruvate	0,3 g
Potassium Phosphat Dibasic	0,3 g
Magnesium Sulfate	0,05 g
Bacto Agar	15 g

Pladerne støbes i Ø=9 cm sterile petriskåle. Da P17 er følsom over for fugt, er det vigtigt, at plader tørres inden de anvendes til AOC bestemmelse.



## AOC-metoden

AOC-metoden er et bio-assay, hvor en vandprøves AOC-værdi bestemmes ud fra det antal bakterier, der kan vokse op på de organiske kulstofforbindelser i prøven. Vandprøven tappes i en kulstoffri testflaske, og prøvens naturlige bakteriepopulation inaktiveres ved pasteurisering. Prøven podes efterfølgende med to bakteriestammer, *Pseudomonas fluorescens*, stamme P17 og Aquaspirillum, stamme NOX, der tilsammen kan omsætte langt størstedelen af de organiske kulstofforbindelser i drikkevand /van der Kooij et al., 1995/. Prøven inkuberes i mørke ved 15°C, og bakterieantallet følges over tid ved at bestemme kimtallet på R<sub>2</sub>A, et lavsubstrat medie specielt egnet til bestemmelser på næringsfattige miljøer (sammensætningen af R<sub>2</sub>A er angivet i Bilag B). Vækstkurvens maksimale bakterieantal omsættes til prøvens AOC-værdi udtrykt i acetat-C ækvivalenter/L ved brug af udbyttekonstanter for P17 og NOX på acetat. Udbyttekonstanterne for acetat-koncentrationer på 5-250 µg acetat-C/L er 4,1 \* 10<sup>6</sup> CFU/µg acetat-C for P17 og 1,2 \* 10<sup>7</sup> CFU/µg acetat-C for NOX /van der Kooij et al., 1995/.

Nedenfor er arbejdsgangen for AOC-metoden gennemgået i den udgave, der dannede grundlag for projektet.

### C. 1. Udførelse

Alt arbejde med åbne prøver og podekulturer forgår i sterilbænk.

AOC-bestemmelser udføres i triplikat med 200 mL vandprøve i hvert enkelt testflaske (250 mL 'red cap'-flaske [PYREX] med 'red cap'-låg med teflonindlæg [SCHOTT DURAN]). Prøvens naturlige bakteriepopulation inaktiveres ved pasteurisering i 30 minutter ved 60°C. For at varme på prøven i så kort tid som muligt, opvarmes prøven hurtigt i 90°C vandbad. Temperaturen følges i en referenceflaske, der behandles som prøveflaskerne. Når temperaturen i referenceflasken når 60°C, overføres prøven til 60°C varmeskab, hvor den henstår i 30 minutter. Efter afkøling i isbad til testtemperaturen podes prøven med P17 og NOX til en startkoncentration på 200-500 CFU/mL. Prøven inkuberes ved 15°C indpakket i stanniol for at hindre algevækst og photokemisk nedbrydning.

Under inkuberingen følges bakterieantallet ved overfladeudsæd på R<sub>2</sub>A, hvor pipetteringer foretages med finpipetter med engangsspidser af polypropylen. Inden prøveudtagning fra en flaske føres denne i kraftige horisontale cirkelbevægelser for at homogenisere prøven. Når fortynding af en prøve er nødvendig, fremstilles en ti-fold fortyndingsrække ved at overføre 100 µL prøve til eppendorf-rør med 900 µL autoklaveret postevand. Der omblendes ved vortex-mixning, og herudfra fremstilles den videre fortyndingsrække på samme vis, indtil de ønskede fortyndinger er opnået. Skal den ufertyndede prøve udplades, udtages der i stedet 300 µL prøve til

tomt eppendorf-rør, hvorfra udpladning foretages og den videre fortyndingsrække fremstilles.

Fra tre fortyndinger udplades 50 µL i triplikater, ialt 9 plader. Kolonier optælles efter 2-3 dages inkubation ved 25°C, idet forskel i kolonimorfologi gør det muligt at skelne imellem P17 og NOX. P17 fremtræder som beige farvede kolonier på 2-3 mm i diameter, mens NOX vil ses som mindre grå-hvide kolonier med en diameter på 1-2 mm. Plader med over 200 kolonier (af både P17 og NOX) optælles generelt ikke.

For hver enkelt bestemmelse beregnes kimtallet som et vægtet gennemsnit ud fra den totale udstrøgne prøvemængde og det totale antal talt kolonier i prøvemængden. Den observerede spredning (error of the mean, e.o.m) på kimtallet følger en Poisson fordeling og vil følgelig være  $\sqrt{C}$ . Kimtallet bestemmes således som:

$$Y = \frac{\sum C_i \pm \sqrt{\sum C_i}}{\sum W_i} = \frac{C \pm \sqrt{C}}{W} \quad \text{/Niemelä, 1983/}$$

$C_i$ : antal kolonier fra enkel udstrygning i fortyndingsrækken  
 $W_i$ : volumenet udstrøget

De højst opnåede kimtallet for P17 og NOX omregnes til AOC-værdier ved brug af udbyttekonstanter på acetat. Prøvens total AOC-værdi bestemmes som:

$$AOC_{\text{Total}} = AOC_{\text{P17}} + AOC_{\text{NOX}}$$

### C. 1. 1. Rensningsprocedure for udstyr

Flasker, låg og finnpipetter anvendes udelukkende til AOC-bestemmelse for at hindre, at anden tidligere anvendelse medfører afgivelse af organisk stof eller stof, der virker hæmmende på bakterievækst.

For at fjerne organisk kulstof rengøres testflasker og låg inden brug ved følgende procedure:

- Skylles med MilliQ-vand
- Henstand i 10% salpetersyre i minimum et døgn
- Skylles 6 gange med MilliQ-vand
- Mundingene dækkes med stanniol
- Glasflasker glødes ved 220°C i 5 timer - 'red cap'-læg ved 180°C i 6 timer

Pipettespidser renses ikke specielt før brug, men tages direkte fra leveringsposer. Spidser, der skal i direkte kontakt med prøve, pakkes iført vinyl-engangshandsker for at begrænse overførsel af organisk materiale. Eppendorf-rør og pipettespidser autoklaveres og tørres derefter ved 80°C.

Til desinficering af arbejdsområde og drigalskispotter anvendes der ikke sprit, da dette vil kontaminere prøverne med organisk stof og resultere i forhøjet P17 koncentrationer. Arbejdsområde aftørres med en 0,05% CTMAK-opløsning (cetyltrimethylammoniumchlorid), og drigalskispotter glødes i gasflamme og afkøles inden brug.

### C. 1. 2. Podekulturer

Separate podekulturer af P17 og NOX fremstilles ved opdyrkning af bakterierne ved 15°C i næringssaltsmedie med 1 mg/L acetat /van der Kooij et al., 1995/. Bakteriernes vækst følges ved overfladeudsæd på R<sub>2</sub>A, indtil et maksimalt bakterieantal er opnået. Herefter opbevares kulturene i køleskab, hvor de har en holdbarhed på omkring et halvt år.

### C. 2. Ændringer i forhold til van der Kooij metode

Den ovenfor beskrevet arbejdsgang ved udførelse af AOC-metoden afviger på nogle punkter fra /van der Kooij et al., 1995/. I Tabel C-1 er de afgørende punkter listet. I den oprindelige AOC-metode udføres bestemmelserne i 1 L Erlenmeyerkolber. Det er imidlertid ofte mere hensigtsmæssigt at benytte "red cap"-flasker til bestemmelserne. Transport og håndtering af prøver er lettere i "red cap"-flasker end i Erlenmeyerkolber, da "red cap"-lågene er skruet fast og dækker hele flaskemundingen. Ved brug af Erlenmeyerkolber risikeres det endvidere, at propperne hopper op under transport og pasteurisering. Der er således umiddelbart langt mindre risiko for at prøverne kontamineres fra omgivelserne ved at anvende "red cap"-flasker. I projektets arbejde var det endvidere hensigtsmæssigt pga. mængden af testmateriale og ønsket om fastholdt S/V-forhold at benytte mindre vandvolumener end 600 mL, hvorfor der blev valgt 250 mL flasker.

Parameter	/van der Kooij et al., 1995/	IMT
Testflasker	1000 mL Erlenmeyer kolbe med glasslib og tilhørende glasprop	250 mL 'red cap'-flasker med 'red cap'-låg
Vandvolumen	600 mL	200 mL
Renseprocedure	<ul style="list-style-type: none"><li>• Maskinopvask</li><li>• Skylles med dem. vand</li><li>• Kolber og låg brændes sammen ved 550 °C i 4 h</li></ul> <i>Alternativt:</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• Henstand i konc. Dichromat natten over</li><li>• Skylles med varmt drikkevand</li><li>• Henstand i 1 h i salpetersyre</li><li>• Skylles i varmt drikkevand</li><li>• Brændes ved 250 °C i 8 h</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Skylles med MilliQ-vand</li><li>• Henstand i 10% salpetersyre i minimum et døgn.</li><li>• Skylles 6 gange med MilliQ-vand</li><li>• Munding dækkes med stanniol</li><li>• Glasflasker brændes ved 220°C i 5 h - 'red cap'-låg ved 180 °C i 6 h</li></ul>
Pipetter	Glødede stangpipetter af glas	Finnpipetter med engangsspidser af polypropylen
Fortyndings-procedure	9 mL postevand autoklaveret i fortyndingsrør tilsættes 1 mL prøve	0,900 mL autoklaveret postevand i eppendorf-rør tilsættes 0,100 mL prøve

Tabel C-1: Punkter hvor udførelsen af AOC-metoden gennemgås i afsnit 0 afviger fra /van der Kooij et al., 1995/.

Rensningen af testflaskerne er modificeret i forhold til van der Kooij et al.'s forskrift /1995/, da de færreste laboratorier har kapacitet til at gløde et større antal flasker ved 550°C. Den forskrevne metode anses for bedre end den alternative metode foreslået af van der Kooij et al. /1995/, da syrevasken er

forlænget, og der anvendes MilliQ-vand (lavt indhold af organisk stof) til skylning.

Autoklavering af fortyndingsrør med fortyndningsvæske medfører ofte en ukontrolleret fordampning af fortyndingsvæsken, hvilket vil give usikkerheder ved fortyndingen. Der opnås derfor en større præcision ved at udmåle fortyndingsvæsken efter autoklaveringen. Derved kan det samtidigt forsvares at anvende mindre volumener ved fremstilling af fortyndingsrækker, så de kan fremstilles i eppendorf-rør og med finpipetter fremfor stangpipetter, da dette håndteringsmæssigt er mere praktisk (automatpipetter med engangsspidser anvendes af Standard Methods /1998/).

### C. 3. Undersøgelse af forskellige flaske- og lågtyper

En mulig risiko ved at anvende "red cap"-flasker med tilhørende låg fremfor Erlenmeyerkolber kunne være, at der blev afgivet forbindelser fra lågenes teflon-indlæg til vandfasen, som vil kunne påvirke bestemmelsen. For at kontrollere dette blev der foretaget en sammenlignende undersøgelse med både Erlenmeyerkolber og "red cap"-flasker. Teflon-indlæggene i "red cap"-lågene kan kun holde til at undergå rensningsproceduren et begrænset antal gange, før de skal udskiftes. Det blev derfor endvidere undersøgt, om der var en effekt af, om indlæg (monteret i lågene) havde gennemgået rensningsproceduren én eller flere gange.

#### C. 3. 1. Forsøgsgang

Undersøgelsen blev udført med 250 mL Erlenmeyerkolber med tilhørende propper med glasslib og 250 mL "red cap"-flasker med låg, hvor lågenes indlæg henholdsvis havde undergået rensningsproceduren en enkelt gang ("nye" indlæg) eller mere end én gang ("gamle" indlæg). Efter pasteurisering af testvandet (200 mL) i flaskerne, blev flaskerne inkuberet ved 20°C under omrystning (95 min<sup>-1</sup>).

Erlenmeyerkolberne blev inkuberet med et omvendt bægerglas over for at undgå kontamineringer med støv (ifølge van der Kooij et al. /1995/). To sæt "red cap"-flasker blev inkuberet med låget opad (ingen kontakt imellem indlæg og vandfase) og to sæt med låget nedad (kontakt imellem indlæg og vandfase) - et med "gamle" indlæg og et med "nye" indlæg. Undersøgelsen blev således udført med 3 Erlenmeyerkolber, 2×3 "red cap"-flasker med "nye" indlæg og 2×3 "red cap"-flasker med "gamle" indlæg.

Dag 7 blev alle "red-cap"-flasker og Erlenmeyerkolber podet med P17, og derefter indkuberet (uden kontakt mellem vandfase og indlæg) ved 15°C med kimtalsbestemmelse dag 0, 5, 7, 10, 14, 20, 25. Dag 25 blev alle flasker og kolber tilsat 1 mL acetat-opløsning (der resulterede i omkring 25 µg acetat-C/L i de enkelte prøver) for at undersøge om der var hæmmende faktorer i vandfasen. Efterfølgende blev kimtallet bestemt dag 28 og 30, idet P17 med den anvendte acetat-koncentration ville være udvokset inden for 5 døgn).

#### C. 3. 2. Resultater

Der var mindre end 20 CFU/mL P17 i vandfasen i to af flaskerne, hvor "nye" indlæg var i kontakt med vandfasen, hvorfor disse blev podet med P17 på ny dag 25, forud for kimtalsbestemmelse og tilsætning af acetat. Vækstkurver for



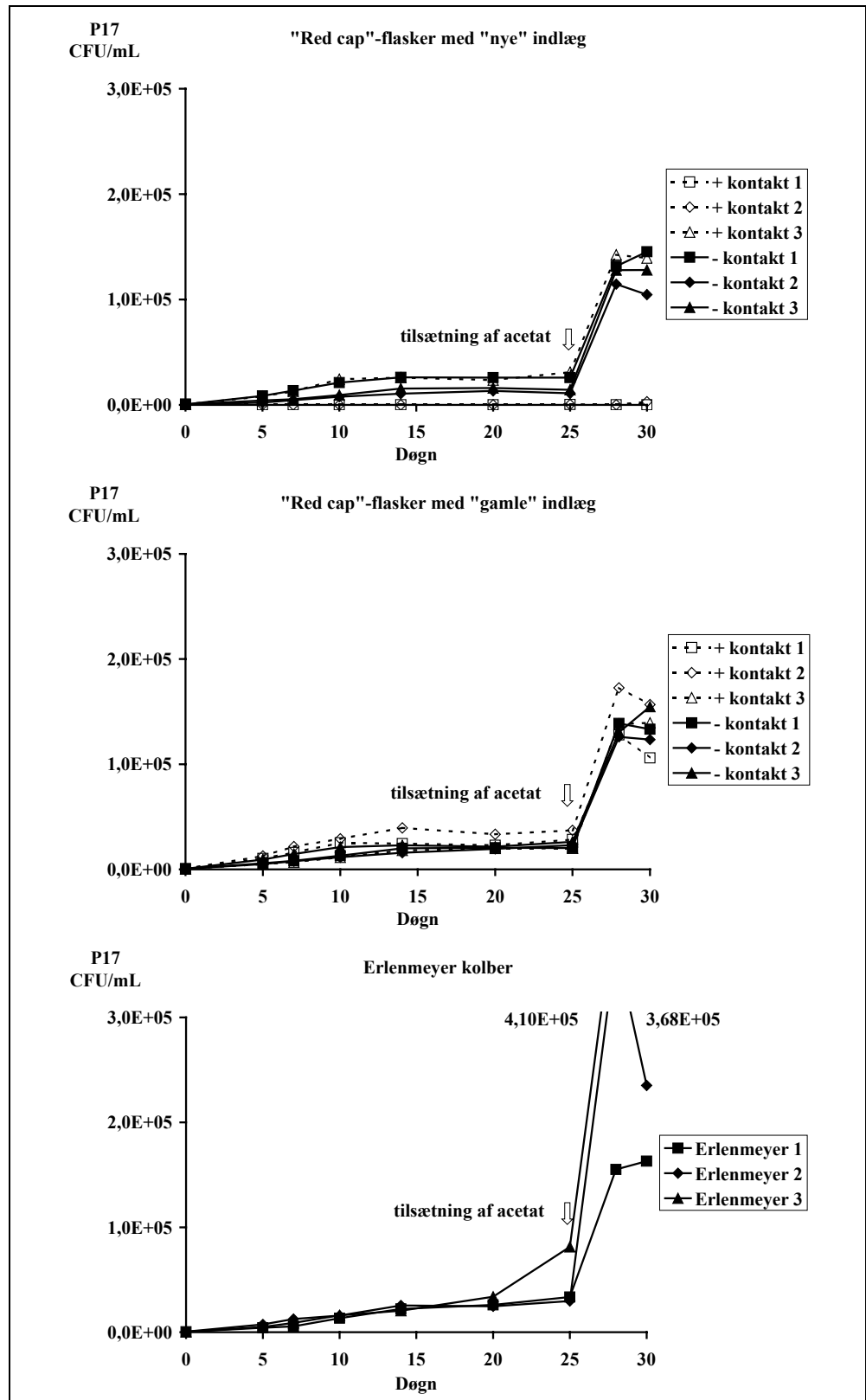
P17 er afbilledet på Figur C-1, og maksimale  $AOC_{P17}$ -koncentrationer er angivet i Tabel C-2.

De meget høje værdier efter tilsætning af acetat til Erlenmeyerkolberne samt værdien for "Erlenmeyer 3" dag 25 skal nok ikke tolkes som et reelle respons. Propperne satte sig fast i slibene imellem de enkelte kimtalsbestemmelser, hvilket betød, at der blev rørt meget ved området omkring kolbehalsen og proppen (især ved de tre sidste gange). Desuden stod der vand i slibene; såfremt dette var blevet fjernet ved opvarmning af kolbehalsen over en gasflamme ville det (pga. den lille flaskestørrelse) have medført en for kraftig opvarmning af vandfasen.

I to af prøverne, hvor vandfasen var i kontakt med "nye" indlæg, forekom der ingen vækst af P17, heller ikke efter repodning og tilsætning af acetat. I de øvrige flasker var der en tilfredsstillende tilvækst af P17 efter tilsætning af acetat (jævnfør Tabel C-2).

Vandfase/Indlæg	"Red cap"-flasker				Erlenmeyer- kolber
	Kontakt		Ingen kontakt		Ingen kontakt
	Én [ $\mu\text{g}$ acetat-C/L]	Mere end én [ $\mu\text{g}$ acetat-C/L]	Én [ $\mu\text{g}$ acetat-C/L]	Mere end én [ $\mu\text{g}$ acetat-C/L]	[ $\mu\text{g}$ acetat-C/L]
Max. $AOC_{P17}$	0 0 8	7 10 5	6 3 4	5 5 6	8 7 20
Tilvækst i $AOC_{P17}$ ved til- sætning af 25 $\mu\text{g}$ acetat-C/L	0 1 27	25 33 29	29 25 28	29 25 31	32 83 80

Tabel C-2:  $AOC_{P17}$ -værdier i vandprøver målt dels i "red cap"-flasker og Erlenmeyerkolber. Vandprøverne blev efter pasteurisering inkuberet ved 20°C under omrystning i 7 døgn. Efterfølgende blev  $AOC$  bestemt ved 15°C. Til kontrol for hæmning i vandfasen fik prøverne tilsat acetat dag 25 efter podning



Figur C-1: Vækstkurver for P17 i vandprøver inkuberet i Erlenmeyerkolber med propper med glasslib og i "red cap"-flasker med låg med henholdsvis "nye" og "gamle" indlæg. "Red cap"-flaskerne blev inkuberet med og uden kontakt imellem indlæg og vandfase. Flaskerne blev inkuberet ved 20°C under omrystning i 7 døgn, hvorefter de blev podet med P17 og inkuberet ved 15°C. Dag 25 blev prøverne tilsat acetat.

Den udeblevne vækst i de to flasker kan enten tilskrives tilstedeværelsen af toksiske/hæmmende stoffer i vandfasen eller, at vandfasen har været kontamineret med bakterier, som ikke blev registreret på R<sub>2</sub>A pladerne. I et sådant tilfælde har de pågældende bakterier haft 7 døgn forspring og således udkonkurreret P17. Ved tilsætning af acetat har disse bakterier i stærkt overtal kunne omsætte acetaten, før P17 kunne vokse op. Væksten i den tredje af flaskerne hvor "nye" indlæg var i kontakt med vandfasen var i overensstemmelse med væksten i de øvrige flasker. Sammenholdt med de senere udførte undersøgelser i Kapitel 8, er det mest sandsynligt at den udeblivende vækst af P17 i de to flasker skyldes en kontaminering med uønskede bakterier.

Ses der bort fra de to prøver uden vækst, var der på et 5% signifikantsniveau ikke forskel i P17 koncentrationer som følge af de forskellige inkuberinger under inkuberingsforløbet - hellere ikke hvis der opdeles imellem "nye" indlæg, "gamle" indlæg og Erlenmeyerkolber eller kontakt, ingen kontakt og Erlenmeyerkolber (heller ikke når der ses bort fra Erlenmeyerkolbe nr. 3 dag 25). Det kan således ikke siges, at der er effekt af valg af flasketype eller antallet af rensninger "red cap"-lågenes indlæg har undergået. International ringest af AOC-bestemmelse

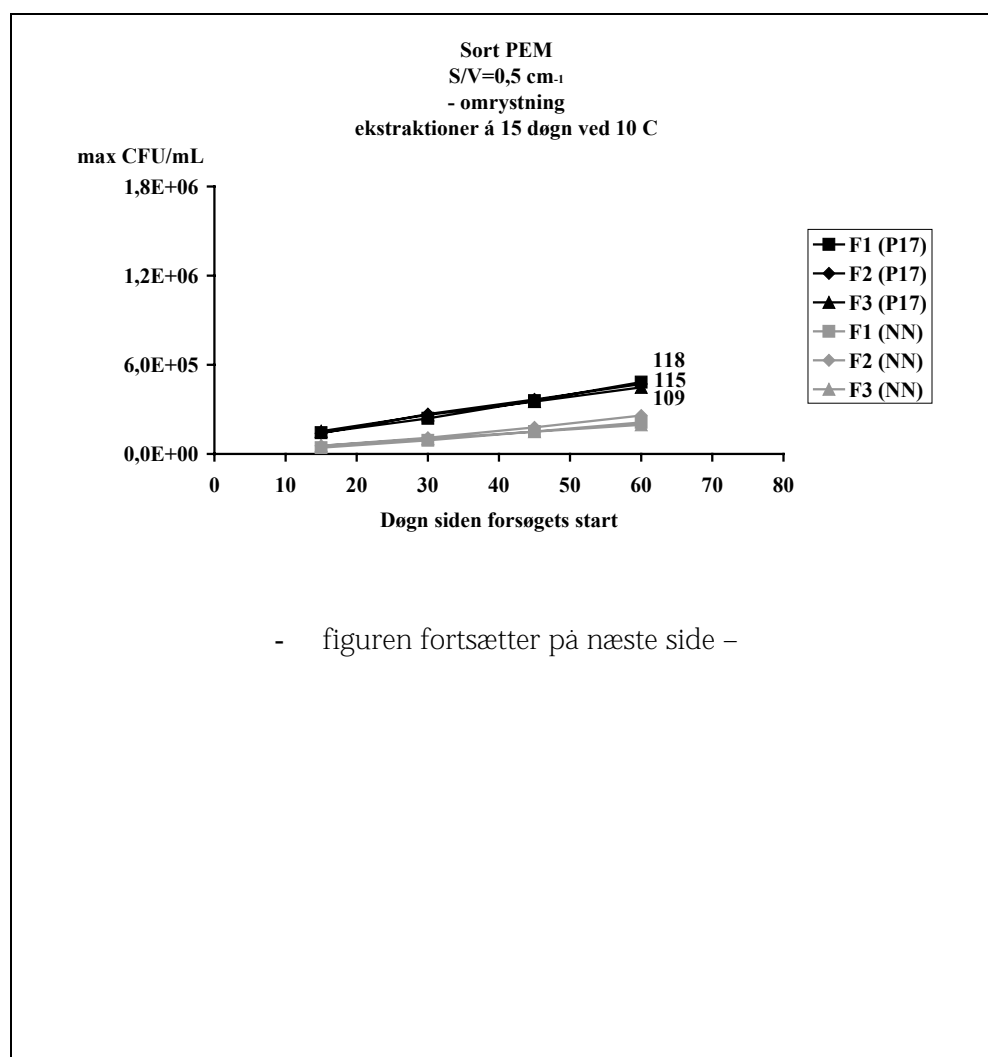
AOC-metoden som beskrevet i afsnit 0 blev anvendt af ÌMT ved en ringtest, der omfattede fem europæiske laboratorier. Indenfor ringtesten blev der analyseret 30 AOC-prøver med tre forskellige koncentrationer. Fire laboratorier opnåede overensstemmende resultater - heriblandt KIWA og ÌMT /Jørgensen et al., 2000/. Den anførte udførelse til bestemmelse af AOC kan således betragtes som velegnet.



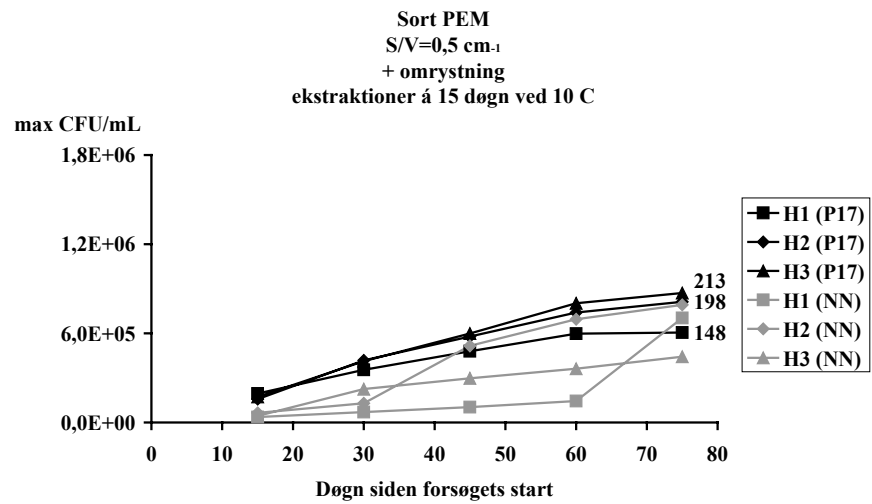
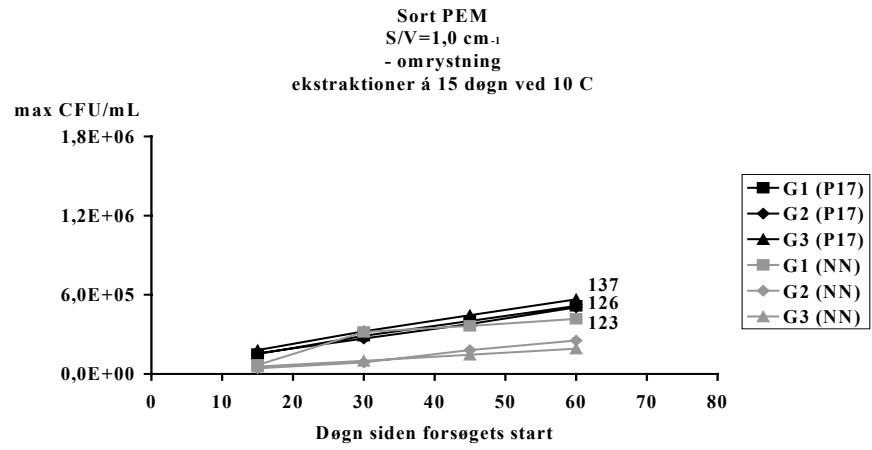
## Akkumulerede kurver for sekventielle ekstraktioner

I Kapitel 6 blev sort PEM materiale blev ekstraheret sekventielt over 60 (75) døgn. Materialet blev ekstraheret i perioder á 15 døgn ved 10°C med og uden omrystning ved S/V-forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup>. Efter hver ekstraktionsperiode blev teststykkerne overført til friskt testvand. De opnåede ekstrakter blev podet med P17, og inkuberet ved 15°C.

For hver serie ekstrakter (ekstrakter fremstillet på samme teststykke) er de maksimale kimtal akkumuleret over tid. I Figur D-1 er de akkumulerede kurver afbildet, idet kimtalsværdien er angivet ud for den dag, hvor ekstraktionen blev afsluttet. For P17 er den akkumulerede AOC-værdi angivet ud for de enkelte kurver.

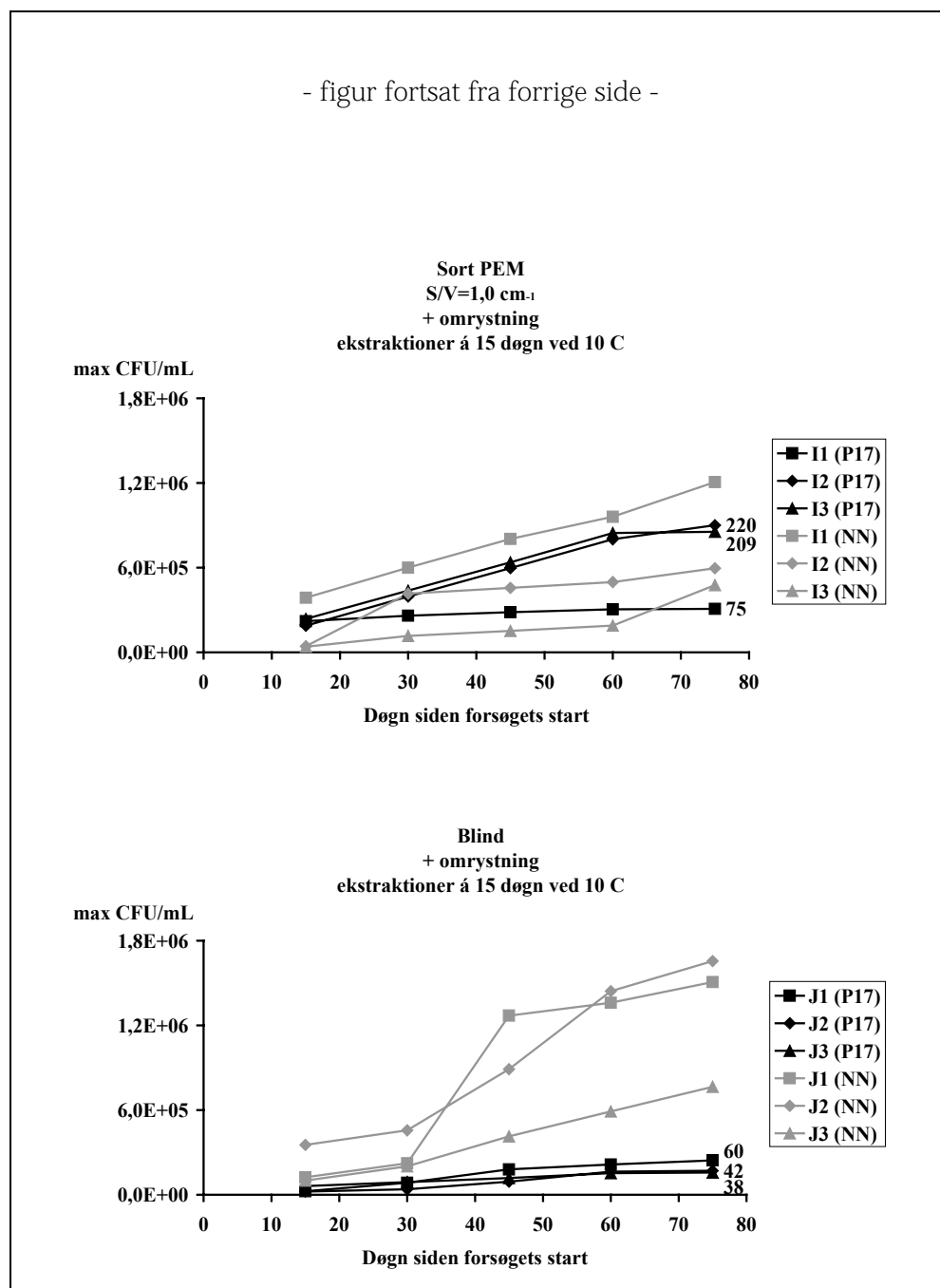


- figur fortsat fra forrige side -



- figuren fortsætter på næste side -

- figur fortsat fra forrige side -



Figur D-1: Akkumulerede kurver for sekventielle ekstraktioner. Materialet blev ekstraheret i perioder af 15 døgñ ved 10°C. Efterfølgende vækst af P17 forgik ved 15°C. Akkumulerede AOC<sub>P17</sub>-værdier er angivet for hver enkel serie ekstraktioner.





## Data fra materialeundersøgelse

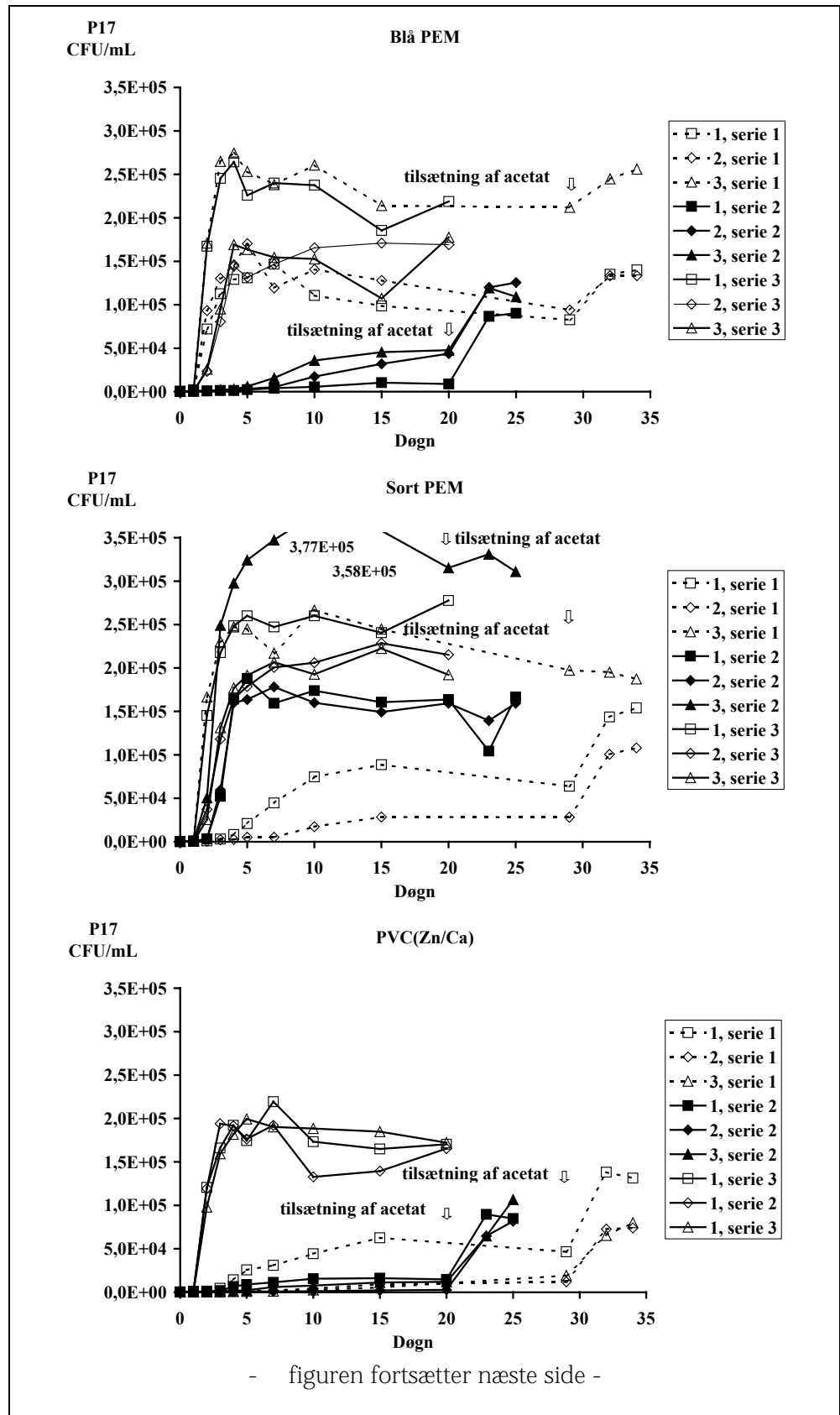
I kapitel 8 blev afgangsværdien fra fem forskellige polymere materialer undersøgt. Materialerne blev ekstraheret over 15 døgn ved 20°C under omrystning ved et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup>. Efterfølgende blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C. Undersøgelsen blev udført i tre serier, hvor serie 1 og 2 efter væksten af P17 blev tilsat acetat, og inkuberet endnu 5 døgn ved 15°C (jævnfør Kapitel 8 for nærmere testforhold).

### E. 1. Vækst af P17

I Figur E-1 er vækstkurver for P17 afbilledet og i Tabel E-1 er AOC<sub>P17</sub>-værdier angivet sammen med tilvæksten i AOC<sub>P17</sub> som følge af acetattilsætningen.

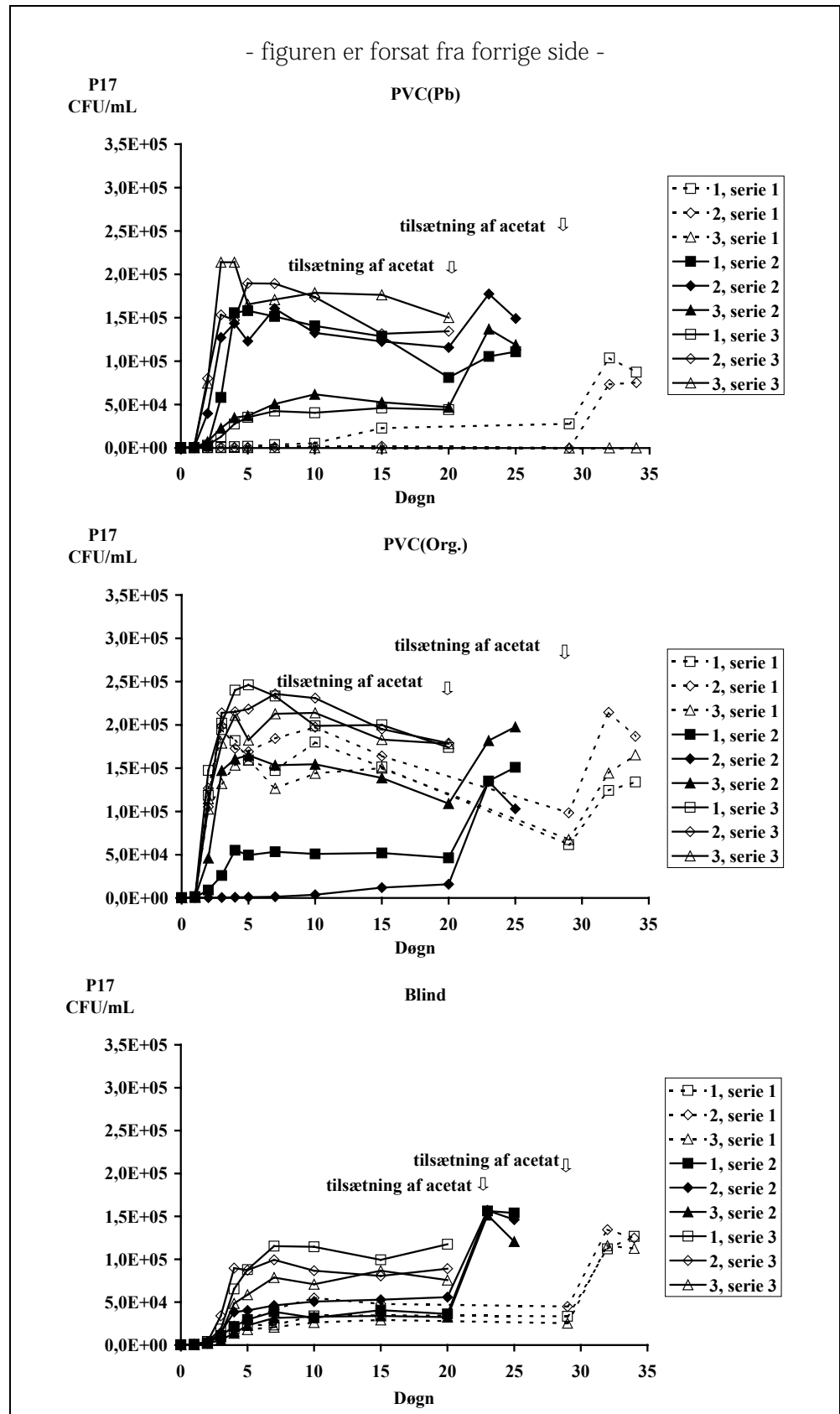
Materiale	AOC <sub>P17</sub>			Tilvækst ved tilsætning af acetat ≈ 20 µg acetat-C/L ≈ 25	
	[µg acetat-C/L]			[µg acetat-C/L]	
	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 1	Serie 2
Blå PEM 1	36	3	64	14	20
Blå PEM 2	42	11	42	10	20
Blå PEM 3	67	12	41	11	17
Sort PEM 1	22	46	63	22	1
Sort PEM 2	7	43	56	20	0
Sort PEM 3	65	92	54	0	4
PVC(Zn/Ca) 1	15	4	54	22	18
PVC(Zn/Ca) 2	3	1	47	15	19
PVC(Zn/Ca) 3	5	3	49	15	23
PVC(Pb) 1	7	39	11	19	7
PVC(Pb) 2	1	39	46	18	15
PVC(Pb) 3	0	15	52	0	22
PVC(Org.) 1	48	13	60	18	25
PVC(Org.) 2	49	4	58	28	29
PVC(Org.) 3	39	40	52	24	22
Blind 1	9	10	28	23	29
Blind 2	13	14	24	22	25
Blind 3	7	8	21	22	29

Tabel E-1: Maksimale AOC<sub>P17</sub>-værdier i ekstrakter af polymert materiale (Bl indværdi ikke fratrukket). Ekstraktionerne blev udført ved 20°C over 15 døgn under omrystning ved et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup>, mens væksten af P17 foregik ved 15°C.



- figuren fortsætter næste side -

- figuren er forsat fra forrige side -



Figur E-1: Vækstkurver for P17 i ekstrakter af 5 forskellige polymere materialer og tilhørende blindprøver. Ekstraktionerne blev udført ved 20°C over 15 døgn under omrystning ved et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup>, mens væksten af P17 foregik ved 15°C. Alle materialer blev undersøgt i tre serier.

## E. 2. ATP-data

Da der var problemer med kontaminering med uønskede bakterier under ekstraktionen, som ikke blev registreret ved kimtalsbestemmelse, blev der på dage med kimtalsbestemmelse endvidere bestemt ATP. ATP-værdier større end 5 pg ATP/mL på dag 0 indikerer, at ekstraktet har været kontamineret med uønskede bakterier under ekstraktionen. I nedenstående tabeller er ATP-data for henholdsvis serie 1, 2 og 3 angivet.

Replika		Dag 0 [pg ATP/mL]					
		Blå PEM	Sort PEM	PVC(Zn/Ca)	PVC(Pb)	PVC(Org.)	Blind
Serie 1	1	≤5	454	936	85	≤5	≤5
	2	≤5	129	336	817	≤5	≤5
	3	≤5	≤5	321	74	≤5	≤5
Serie 2	1	14	≤5	85	≤5	26	≤5
	2	352	≤5	24	≤5	98	≤5
	3	223	≤5	137	17	≤5	≤5

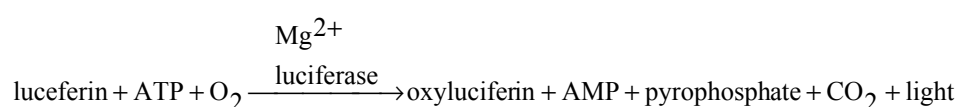
Tabel E-2: ATP data for ekstrakter fra serie 1 og 2 målt dag 0 efter podningen med P17. Ekstraktionerne blev udført ved 20°C over 15 døgn under omrystning ved et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>1</sup>, mens væksten af P17 foregik ved 15°C.

Replika		[pg ATP/mL] Dag									
		0	1	2	3	4	5	7	10	15	20
Blå PEM	1	≤5	≤5	26	34	54	57	39	29	46	45
	2	18									
	3	17									
Sort PEM	1	≤5	≤5	24	34	40	49	32	39	42	47
	2	13									
	3	33	39	34	48	58	55	49	36	38	32
PVC(Zn(Ca))	1	≤5	≤5	15	28	37	43	29	31	33	34
	2	≤5	≤5	15	25	27	30	27	30	25	26
	3	≤5	≤5	11	28	30	36	29	34	26	26
PVC(Pb)	1	33	26	33	34	23	19	14	12	8	6
	2	≤5	≤5	11	15	27	25	22	18	16	18
	3	≤5	≤5	13	23	27	30	29	27	28	26
PVC(Org.)	1	≤5	≤5	19	24	47	41	27	30	30	33
	2	≤5	≤5	17	21	37	37	20	20	19	23
	3	≤5	≤5	21	28	40	41	34	27	27	31
Blind	1	≤5	≤5	≤5	≤5	11	12	16	16	13	13
	2	≤5	≤5	≤5	9	12	14	13	12	10	10
	3	≤5	≤5	≤5	≤5	7	10	11	11	11	11

Tabel E-3: ATP-data for ekstrakter fra serie 3 målt efter podningen med P17. Ekstraktionerne blev udført ved 20°C over 15 døgn under omrystning ved et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>1</sup>, mens væksten af P17 foregik ved 15°C.

## ATP; princip og metode

Alle levende celler indeholder adenosine triphosphate (ATP), som spiller en vigtig rolle i cellernes enzymaktivitet og energilagring. ATP-niveauet i cellerne er nøje reguleret, og kan derved anvendes som et mål for cellekoncentrationen i en given vandig prøve. ATP-koncentrationen bestemmes udfra en enzymatisk reaktion katalyseret af luciferase<sup>1</sup>:



Den resulterende lysudsendelse er direkte proportionel med ATP-koncentrationen. Lysudsendelsen detekteres vha. en photomultiplier, der angiver lysmængden i 'relative light units' (rlu).

Før en prøve måles, tilsættes denne et reagens, der frigiver intercellular ATP til vandfasen. Prøven tilsættes herefter en enzymopløsning indeholdende luciferin og luciferase, og lysudsendelsen måles.

Da den enkelte prøves karakter (farve, turbiditet, pH osv.) kan påvirke enzymets aktivitet (og dermed den optimale lysudsendelsen), måles der for hver prøve endvidere en intern standard, hvormed målingen af prøven kan korrigeres.

Den korrigerede rlu-værdi omsættes vha. standardkurve til en ATP-koncentration, der generelt opgives i pg ATP/ml.

I dette projekt blev måling af ATP foretaget med indstillingerne:

T = 25°C

10 s ekstraktionstid

10 s integrationstid efter 2 s delay

Prøver til ATP-måling udtages i ATP-fri eppendorf-rør, og opbevares indtil måling ved -80°C.

Prøver fra serie 1 og 2 (Kapitel 8) blev målt på Biocounter Model 2010 fra Lumac, med reagens-kit NRB/LUMIT-PM fra Celsis.

Prøver fra serie 3 (Kapitel 8) blev målt på Biocounter Model Advance Coupe fra Celsis med reagens-kit PCP fra Celsis.

---

<sup>1</sup> Fra *Photinus pyralis* (American firefly)

Prøver fra desinfektionsundersøgelsen i Bilag G blev målt på Biocounter Model Advance Coupe fra Celsis med reagens-kit NRB/LUMIT-PM fra Celsis.

# Desinfektionsundersøgelse

Ved undersøgelsen af sekventielle ekstraktioner (Kapitel 6) var pasteuriseringen (60°C i 30 minutter), der blev benyttet forud for AOC-bestemmelsen, ikke tilstrækkelig til inaktivere alle prøvernes bakterier. Problemet blev da løst ved at øge pasteuriseringen til 60°C i 45 min. Ved undersøgelsen af udvalgte materialer (Kapitel 8) var der imidlertid problemer med bakterier, der heller ikke blev inaktiveret ved denne forøgede pasteurisering. Det blev derfor undersøgt, om disse bakterier også kunne inaktiveres, blot de rette pasteuriseringsforhold blev fundet.

## G. 1. Pasteuriseringsforhold

I litteraturen omhandler de fleste tilfælde med pasteurisering i reglen prøver af fødevarer eller gødning (eksempler er givet i Tabel G-1), hvilket ikke gav en endegyldig løsning. Desuden kunne det tænkes, at en reduktion af biomassen i vandet ved en sterilfiltrering inden pasteurisering kunne afhjælpe problemet med overlevelse af bakterier.

Pasteuriseringsforhold	Kilde
70°C i 30 min	Ward et al., 1999; Standard Methods, 1998; Escobar et al., 2000
80°C i 10 min	Schlegel, 1986
85°C i 10 min	Gill et al., 1998
85°C i 15 min	Gill et al., 1997

Tabel G-1: Eksempler på pasteuriseringstemperaturer anvendt i litteraturen.

### G. 1. 1. Undersøgelsen

Der blev udført en sammenlignende undersøgelse af følgende pasteuriseringsforhold:

- 60°C i 45 minutter - postevand med teststykker opvarmes i vandbad og overføres til ovn.
- 60°C i 45 minutter (sterilfiltreret postevand) - testvand med teststykker opvarmes i vandbad og overføres til ovn.
- 70°C i 30 minutter - postevand opvarmes i vandbad, teststykker tilsættes og overføres til ovn.
- 80°C i 10 minutter - postevand opvarmes i vandbad, teststykker tilsættes og overføres til ovn.
- 85°C i 15 minutter - postevand opvarmes i vandbad, teststykker tilsættes og overføres til ovn.
- 85°C i 30 minutter - postevand opvarmes i vandbad, teststykker tilsættes og overføres til ovn.

Teststykkerne blev tilsat vandet efter opvarmning til den ønskede temperatur, når denne var 70°C og opefter. Dette blev valgt, da det tog relativt lang tid at varme vandet op i vandbad, og det var ikke ønskeligt, at teststykkerne skulle udsættes for de relativt høje temperature i længere tid end fastsat ovenfor.

Undersøgelsen blev udført med teststykkerne af blå PEM og PVC (Zn/Ca) fra serie 2 (Kapitel 8). Siden optagningen havde teststykkerne blot været opbevaret i et bægerglas uden nogen form for forholdsregler for at undgå kontamineringer eller lignende. For at sikre at teststykker var kontamineret med de bakterier, som gav problemer, blev teststykkerne inden pasteuriseringen inkuberet 3 døgn ved 20 °C under omrystning i vandfaser fremstillet ud fra de kontaminede ekstrakter fra serie 2: Triplikate ekstrakter af henholdsvis blå PEM og PVC (Zn/Ca) blev anvendt. For hver materialetype blev halvdelen af de triplikate ekstrakter overført til en 1 L flaske og blandet i forholdet 1:1 med upasteuriseret postevand, for at sikre tilstrækkelig mængde af næringssalte.

Teststykkerne blev enkeltvis overført (uden skylning) til testflasker med 200 mL postevand (for to af flaskernes vedkommende sterilfiltreret postevand), og pasteuriseret som angivet ovenfor. Efter afkøling blev der udtaget en prøve til måling af ATP, og flaskerne blev inkuberet 7 døgn ved 20°C under omrystning for at give eventuelle aktive bakterier mulighed for vækst. Herefter blev hver enkelt prøve kontrolleret for vækst ved måling af ATP og udpladning af 0,5 mL på R<sub>2</sub>A (enkelt plade per prøve). Pladerne blev inkuberet ved 25°C og kontrolleret for vækst efter 9 og 15 døgn.

### **G. 1. 2. Resultater**

Alle prøverne var kontamineret med bakterier, som gav anledning til kolonier på R<sub>2</sub>A, dog var antallet af kolonier aftagende med stigende behandling (jævnfør Tabel G-2). For prøver pasteuriseret ved 60-80°C voksede kolonierne op inden for de første 9 døgn inkubering, mens langt de fleste kolonierne fra prøver pasteuriseret ved 85°C voksede op inden for de sidste 5 døgn inkubering. Derudover var der forskel i kolonimorfologi, idet der var mindre artsdiversitet med stigende varmebehandling.

Målingerne af ATP lige efter pasteuriseringen (dag 0) viste en klar tendens til stigende ATP-værdi med stigende behandling (Tabel G-3). Da det må antages, at der ved overførelsen af teststykkerne inden pasteuriseringen er blevet overført et sammenligneligt antal bakterier, må variationerne i ATP-værdi skyldes en reaktion på opvarmningen.



Pasteuriseringsforhold	PVC(Zn/Ca) CFU/plade	Koloni-sammensætning	Blå PEM CFU/plade	Koloni-sammensætning
60°C, 45 min steril	>> 300	3 dominerende	>> 300	3 dominerende
60°C, 45 min	>> 300	3 dominerende	>> 300	3 dominerende
70°C, 30 min	5	1 dominerende	280	1 dominerende
80°C, 10 min	12	1 dominerende	~ 300	1 dominerende
85°C, 15 min	25	1 dominerende	~ 200	1 dominerende
85°C, 30 min	22	1 slags	~ 80	1 slags

Tabel G-2: Kolonitantal opnået på R2A- plader fra undersøgelsen af pasteuriseringsforhold efter 15 døgns inkubering ved 25°C. Siden pasteuriseringen havde prøverne været inkuberet 7 døgn ved 20°C med omrystning.

Pasteuriseringsforhold	PVC(Zn/Ca) [pg ATP/mL]		Blå PEM [pg ATP/mL]	
	Dag 0	Dag 7	Dag 0	Dag 7
60°C, 45 min steril	1	37	6	470
60°C, 45 min	2	29	4	647
70°C, 30 min	3	19	11	83
80°C, 10 min	22	22	46	30
85°C, 15 min	30	16	64	7
85°C, 30 min	21	34	72	37

Tabel G-3: ATP-værdier i prøver fra undersøgelsen af pasteuriseringsforhold før og efter 7 døgns inkubering ved 20°C med omrystning.

Både kimtalsbestemmelserne og ATP-værdierne efter 7 døgns inkubering viser, at det at hæve pasteurisering fra 60°C, 45 minutter til 70°C, 30 minutter giver en betydelig reduktion af overlevende bakterier. Yderligere hævnings af pasteuriseringsforholdene giver ikke en videre reduktion i en tilsvarende størrelsesorden.

Ingen af blindprøverne i Kapitel 8 var kontamineret, hvilket indikerer at overlevelsen af uønskede bakterier er forbundet med materialet. Dette bekræftes af denne undersøgelse, hvor fjernelse af testvandets bakterier inden pasteurisering (60°C, 45 minutter, steril) havde en relativt lille effekt på de målte kontamineringer. En tilsvarende pasteuriseringsundersøgelse med kontamineret vand alene viste, at 70°C, 30 minutter var tilstrækkeligt til at inaktivere alle de uønskede bakterier, når der ikke var materiale til stede.

## G. 2. Kloring

Da ingen af de undersøgte pasteuriseringsforhold var tilstrækkelige til at inaktivere de uønskede bakterier i forbindelse med materiale, blev kloring endnu engang undersøgt som alternativ til pasteurisering. Der blev anvendt klorkoncentrationer på 25 mg Cl<sub>2</sub>/L (som var en effektiv koncentration ved undersøgelse i Kapitel 5) og 50 mg Cl<sub>2</sub>/L (foreslået af Janne Forslund).

### G. 2. 1. Undersøgelsen

De to vandfaser med bakterier, der blev anvendt til at inokulere teststykkerne i pasteuriseringsundersøgelsen, blev anvendt igen. De to vandfaser blev samlet og fortyndet med postevand i forholdet 1:1 for at sikre tilstrækkelige mængder af næringssalte. Heri blev teststykker inkuberet 2 døgn ved 20°C under omrystning for at sikre, at teststykkerne var kontamineret med de bakterier, som gav problemer. Der blev anvendt teststykker af sort PEM, blå PEM og PVC (Zn/Ca) fra serie 1 (Kapitel 8). Siden optagningen havde teststykkerne blot været opbevaret i et bægerglas uden nogen form for forholdsregler for at undgå kontamineringer eller lignende. Teststykkerne blev efterfølgende overført til kloropløsninger på henholdsvis 25 og 50 mg Cl<sub>2</sub>/L, hvor de blev inkuberet et døgn ved stuetemperatur. Herefter blev teststykkerne taget op, skyllet grundigt med pasteuriseret postevand (70°C, 30 minutter) og overført til testflasker med pasteuriseret postevand. Der blev udtaget en prøve til måling af ATP, hvorefter flaskerne blev inkuberet 7 døgn ved 20°C under omrystning for at give evt. aktive bakterier mulighed for vækst. Der blev desuden inkuberet to flasker kun indeholdende pasteuriseret testvand som kontrol. Efter inkubationen blev der udtaget en ATP-prøve til kontrol for vækst.

### G. 2. 2. Resultater

Klorkoncentration [mg Cl <sub>2</sub> /L]	Materiale	Dag 0 [pg ATP/mL]	Dag 7 [pg ATP/mL]
25	Sort PEM	< 5	23
	Blå PEM	< 5	333
	PVC(Zn/Ca)	< 5	8
50	Sort PEM	< 5	< 5
	Blå PEM	< 5	< 5
	PVC(Zn/Ca)	< 5	< 5
-	Kontrol A	< 5	< 5
	Kontrol B	< 5	< 5

Tabel G-4: ATP-værdier i prøver fra undersøgelsen af pasteuriseringsforhold før og efter 7 døgn inkubering ved 20°C med omrystning.

ATP-værdier for undersøgelsen er angivet i Tabel G-4. De lave ATP-værdier for kontrollerne bekræfter, at pasteurisering ved 70°C, 30 minutter var tilstrækkelig, når der ikke var materiale til stede. Ligeledes viser de lave ATP-værdier i ekstrakter hvor materialet havde været udsat 50 mg Cl<sub>2</sub>/L, at denne koncentration var tilstrækkelig til at inaktivere bakterierne på materialerne, mens bakterierne har kunne overleve 25 mg Cl<sub>2</sub>/L. Metodeovervejelser

De bakterier, som har givet problemer, kan inaktiveres i testvand/postevand ved en pasteurisering ved 70°C, 30 minutter. Bakterierne kan imidlertid klare langt højere temperaturer, når de er i kontakt med materiale. 50 mg Cl<sub>2</sub>/L kunne ved et døgn henstand inaktivere bakterier i forbindelse med materiale, men dette er en relativt høj klorkoncentration. Ved en sådan koncentration er risikoen for, at der sidder klorrester tilbage på teststykkerne efter skylning relativt stor, og bestemmelsen vil således blive behæftet med fejl. Så vidt det er muligt, er det derfor ønskeligt at undgå kloring af teststykkerne med så høje klorkoncentrationer.

I de her beskrevne undersøgelser med pasteurisering og klorning blev der anvendt materiale, som meget koncentreret havde været udsat for de uønskede bakterier. Ovenstående undersøgelser viste at 70°C i 30 minutter var en kraftig forbedring i forhold til 60°C i 45 minutter, mens videre stigning i temperatur ikke havde den store effekt. Da det ikke var ønskeligt at opvarme teststykkerne mere end højst nødvendigt, blev 70°C i 30 minutter blev valgt ud fra den betragtning, at hvis der blev anvendt frisk nyt materiale ville man stadig kunne undgå problemer med overlevelse af bakterier. En sådan undersøgelse blev udført med sort PEM materiale, og ved måling af ATP blev der ikke observeret vækst af uønskede bakterier. Dette indikerede, at den beskrevne behandling var tilstrækkelig, men kunne også skyldes en ændring i vandsammensætningen fra vandværket.



## Rådata

På de efterfølgende sider er angivet rådata fra bestemmelserne af kimtall samt de tilhørende AOC-værdier. For hver enkelte prøve (flaske) er der for hver måledag angivet kimtallet (CFU/mL), den observerede spredning (error of mean, E.O.M.) og antallet af plader, der lå til grund for beregningen af kimtallet (N). Kimtallene (P17 og NOX) er for hver enkelt dag omsat til den modsvarende AOC-værdi, hvilket er angivet i tabellernes nederste del. Ved beregning af AOC-værdier blev udbyttekonstanter for P17 og NOX på acetat fra /van der Kooij et al., 1995/ benyttet.

Der blev set bort fra data, hvis prøven var kontamineret med uønsket bakterier, eller hvis vækstkurver i den pågældende prøve afveg stærkt fra de to øvrige triplikater (jævnfør rapportens afsnit 3.3.3). Der blev bort fra data for både P17 og NOX, blot én af de to stammer udviste en afvigende vækstkurve. Ligeledes blev der set bort fra tællinger, hvor der totalt blev optalt mindre end 15 kolonier af den pågældende bakterie. Data, der ikke indgår i beregningerne, er i nedenstående tabeller overstreget.

## H.1 Ekstraktionsmetoder (jævnfør kapitel 4)

### H.1.1 Ekstraktion uden aktive bakterier

PEX og blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale blev ekstraheret ved et S/V-forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup> over 20 døgn ved 10°C uden omrystning. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og NOX og inkuberet ved 15°C. Væksten af P17 og NOX blev fulgt ved bestemmelse af kimalt på R<sub>2</sub>A dag 20, 25, 27,30, 35, 40 efter forsøgets start. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved 25°C i to-tre døgn. PEX og blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale blev undersøgt i to forsøg, hvorfor hvert materiale har egne blindværdier.

Der blev set bort fra ekstrakt #1, da dette var kontamineret med uønsket bakterier.

		PEX S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	20	5,6E+02	6E+01	3	5,9E+02	6E+01	3	3,3E+02	5E+01	3
	25	2E+03	1E+03	6	4,3E+04	5E+03	6	8,1E+04	7E+03	6
	27	2,7E+03	4E+02	9	7,3E+04	8E+03	5	1,01E+05	9E+03	5
	30	8E+03	2E+03	6	7,2E+04	7E+03	6	1,10E+05	8E+03	6
	35	2E+03	1E+03	9	5,2E+04	6E+03	9	8,8E+04	7E+03	9
	40	2,8E+03	4E+02	9	6,3E+04	6E+03	9	7,0E+04	6E+03	9
NOX	20	4,2E+02	5E+01	3	4,5E+02	5E+01	3	2,4E+02	4E+01	3
	25	6,7E+04	6E+03	6	4,1E+04	5E+03	6	5,3E+04	6E+03	6
	27	7,1E+04	7E+03	6	7,8E+04	8E+03	5	5,7E+04	7E+03	5
	30	6,8E+04	6E+03	6	7,2E+04	7E+03	6	4,0E+04	5E+03	6
	35	6,7E+04	6E+03	9	8,0E+04	7E+03	9	3,4E+04	5E+03	9
	40	6,6E+04	6E+03	6	7,1E+04	7E+03	9	3,6E+04	5E+03	9
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	20	0,14	0,01	3	0,14	0,02	3	0,08	0,01	3
	25	0,4	0,3	6	10	1	6	20	2	6
	27	0,7	0,1	9	18	2	5	25	2	5
	30	1,9	0,5	6	18	2	6	27	2	6
	35	0,6	0,3	9	13	1	9	21	2	9
	40	0,7	0,1	9	15	2	9	17	2	9
NOX	20	0,035	0,004	3	0,037	0,005	3	0,020	0,003	3
	25	5,6	0,5	6	3,4	0,4	6	4,4	0,5	6
	27	5,9	0,5	6	6,5	0,7	5	4,7	0,6	5
	30	5,7	0,5	6	6,0	0,6	6	3,3	0,4	6
	35	5,6	0,5	9	6,7	0,6	9	2,9	0,4	9
	40	5,5	0,5	6	5,9	0,5	9	3,0	0,4	9

		Blind								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	20	4,1E+02	5E+01	3	4,3E+02	5E+01	3	2,4E+02	4E+01	3
	25	1,11E+04	8E+02	9	7,4E+03	7E+02	9	1,41E+04	9E+02	9
	27	1,9E+04	1E+03	9	1,06E+04	8E+02	9	1,7E+04	1E+03	9
	30	2,9E+04	1E+03	9	1,30E+04	9E+02	9	2,2E+04	1E+03	9
	35	2,5E+04	1E+03	9	1,09E+04	8E+02	9	1,32E+04	9E+02	9
	40	2,3E+04	1E+03	9	1,7E+04	1E+03	8	1,6E+04	1E+03	9
NOX	20	4,3E+02	5E+01	3	3,6E+02	5E+01	3	2,5E+02	4E+01	3
	25	8,1E+04	7E+03	6	3,3E+04	1E+03	9	7,2E+04	7E+03	6
	27	6,7E+04	6E+03	6	3,8E+04	2E+03	9	6,8E+04	6E+03	6
	30	6,5E+04	6E+03	6	3,7E+04	1E+03	9	6,6E+04	6E+03	6
	35	5,5E+04	6E+03	6	3,0E+04	1E+03	9	6,8E+04	6E+03	6
	40	4,9E+04	5E+03	6	3,2E+04	2E+03	8	5,6E+04	6E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	20	0,10	0,01	3	0,11	0,01	3	0,06	0,01	3
	25	2,7	0,2	9	1,8	0,2	9	3,4	0,2	9
	27	4,6	0,3	9	2,6	0,2	9	4,2	0,2	9
	30	7,0	0,3	9	3,2	0,2	9	5,3	0,3	9
	35	6,2	0,3	9	2,7	0,2	9	3,2	0,2	9
	40	5,7	0,3	9	4,1	0,3	8	3,8	0,2	9
NOX	20	0,036	0,004	3	0,030	0,004	3	0,021	0,003	3
	25	6,8	0,6	6	2,8	0,1	9	6,0	0,6	6
	27	5,6	0,5	6	3,1	0,1	9	5,7	0,5	6
	30	5,4	0,5	6	3,0	0,1	9	5,5	0,5	6
	35	4,6	0,5	6	2,5	0,1	9	5,7	0,5	6
	40	4,1	0,5	6	2,6	0,1	8	4,6	0,5	6

Der blev set bort fra ekstrakt #3, da dette var kontamineret med uønsket bakterier.

		Blå PEM(n) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	20	4,6E+02	6E+01	3	5,3E+02	6E+01	3	9,9E+02	8E+01	3
	25	6,5E+04	6E+03	6	1,30E+05	8,9E+03	6	2,6E+04	1E+03	9
	27	1,15E+05	8E+03	6	1,19E+05	8,5E+03	6	3,1E+04	1E+03	9
	30	1,10E+05	8E+03	9	1,21E+05	8,5E+03	9	4,0E+04	5E+03	9
	35	7,1E+04	7E+03	9	5,9E+04	6E+03	9	2,8E+04	1E+03	9
40	3,3E+04	4E+03	9	3,3E+04	4E+03	9	1,8E+04	1E+03	9	
NOX	20	2,2E+02	4E+01	3	4,9E+02	6E+01	3	1,8E+02	3E+01	3
	25	5,9E+04	6E+03	6	6,1E+04	6E+03	6	7,6E+04	7E+03	6
	27	5,9E+04	6E+03	6	5,3E+04	6E+03	6	7,5E+04	7E+03	6
	30	6,6E+04	6E+03	9	6,7E+04	6E+03	9	6,1E+04	6E+03	9
	35	5,1E+04	6E+03	9	5,0E+04	6E+03	9	6,2E+04	6E+03	6
40	5,5E+04	6E+03	9	4,0E+04	5E+03	9	5,8E+04	6E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	20	0,11	0,01	3	0,13	0,01	3	0,24	0,02	3
	25	16	2	6	32	2	6	6,3	0,3	9
	27	28	2	6	29	2	6	7,5	0,3	9
	30	27	2	9	30	2	9	10	1	9
	35	17	2	9	15	1	9	6,7	0,3	9
40	8	1	9	8	1	9	4,4	0,3	9	
NOX	20	0,018	0,003	3	0,041	0,005	3	0,015	0,003	3
	25	4,9	0,5	6	5,1	0,5	6	6,3	0,6	6
	27	4,9	0,5	6	4,4	0,5	6	6,3	0,6	6
	30	5,5	0,5	9	5,6	0,5	9	5,1	0,5	9
	35	4,3	0,5	9	4,2	0,5	9	5,2	0,5	6
40	4,6	0,5	9	3,3	0,4	9	4,8	0,5	6	

		Blind								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	20	6,1E+02	6E+01	3	1,1E+03	9E+01	3	6,3E+02	6E+01	3
	25	3,1E+04	1E+03	9	2,3E+04	1E+03	9	2,3E+04	1E+03	9
	27	2,6E+04	1E+03	9	2,0E+04	1E+03	9	2,1E+04	1E+03	9
	30	1,4E+04	3E+03	9	1,6E+04	3E+03	9	1,6E+04	3E+03	9
	35	2,0E+04	1E+03	9	2,1E+04	1E+03	9	1,9E+04	1E+03	9
40	2,0E+04	1E+03	9	1,37E+04	9E+02	9	2,0E+04	1E+03	9	
NOX	20	2,3E+02	4E+01	3	4,5E+02	5E+01	3	2,8E+02	4E+01	3
	25	9,6E+04	8E+03	6	7,9E+04	7E+03	6	5,2E+04	6E+03	6
	27	9,2E+04	7E+03	6	9,9E+04	8E+03	6	6,8E+04	6E+03	6
	30	6,0E+04	6E+03	9	8,2E+04	7E+03	9	7,4E+04	7E+03	9
	35	8,4E+04	7E+03	6	8,4E+04	7E+03	6	5,2E+04	6E+03	6
40	7,6E+04	7E+03	6	4,7E+04	5E+03	6	6,0E+04	6E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	20	0,15	0,02	3	0,27	0,02	3	0,15	0,02	3
	25	7,4	0,3	9	5,6	0,3	9	5,6	0,3	9
	27	6,4	0,3	9	5,0	0,3	9	5,0	0,3	9
	30	3,5	0,7	9	3,8	0,7	9	4,0	0,8	9
	35	5,0	0,3	9	5,0	0,3	9	4,7	0,3	9
40	4,8	0,3	9	3,3	0,2	9	4,8	0,3	9	
NOX	20	0,019	0,003	3	0,037	0,005	3	0,023	0,004	3
	25	8,0	0,6	6	6,6	0,6	6	4,3	0,5	6
	27	7,6	0,6	6	8,3	0,6	6	5,7	0,5	6
	30	5,0	0,5	9	6,9	0,6	9	6,2	0,6	9
	35	7,0	0,6	6	7,0	0,6	6	4,3	0,5	6
40	6,3	0,6	6	3,9	0,4	6	5,0	0,5	6	

## H.1.2 Ekstraktion med P17 og NOX

PEX og blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale blev ved S/V forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup> ekstraheret samme med P17 og NOX. Den samtidig ekstraktion og AOC-bestemmelse forløb over 20 døgn ved 10°C uden omrystning. Væksten af P17 og NOX blev fulgt ved bestemmelse af kimalt på R<sub>2</sub>A dag 0, 5, 7, 10, 15, 20 efter forsøgets start. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved 25°C i to-tre døgn. PEX og blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale blev undersøgt i to forsøg, hvorfor hvert materiale har egne blindværdier.

		PEX S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	1,8E+03	1E+02	3	1,8E+03	1E+02	3	1,01E+03	8E+01	3
	5	3,0E+04	1E+03	8	5,0E+04	6E+03	6	1,8E+04	1E+03	9
	7	2,0E+04	1E+03	9	3,2E+04	2E+03	8	1,7E+04	1E+03	8
	10	2,3E+04	4E+03	9	2,5E+04	4E+03	9	3,1E+04	4E+03	9
	15	2,8E+04	4E+03	9	3,6E+04	5E+03	9	1,6E+04	3E+03	9
	20	8E+02	2E+02	9	4,6E+04	5E+03	6	3,6E+04	5E+03	6
NOX	0	1,31E+03	9E+01	3	1,5E+03	1E+02	3	7,7E+02	7E+01	3
	5	2,7E+04	5E+03	5	5,2E+04	6E+03	6	2,5E+04	1E+03	9
	7	4,5E+04	5E+03	6	1,8E+04	3E+03	6	6,3E+04	6E+03	6
	10	5,1E+04	6E+03	9	3,4E+04	5E+03	9	2,8E+04	4E+03	9
	15	6,2E+04	6E+03	9	5,1E+04	6E+03	9	5,9E+04	6E+03	9
	20	3,5E+04	5E+03	9	5,5E+04	6E+03	6	8,9E+04	9E+03	5
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,44	0,03	3	0,45	0,03	3	0,25	0,02	3
	5	7,2	0,3	8	12	1	6	4,3	0,3	9
	7	4,9	0,3	9	7,7	0,4	8	4,2	0,3	8
	10	5,6	0,9	9	6	0,9	9	8	1	9
	15	6,7	1	9	9	1	9	3,8	0,7	9
	20	0,2	0,1	9	11	1	6	9	1	6
NOX	0	0,32	0,02	3	0,36	0,02	3	0,19	0,02	3
	5	7	1	5	13	1	6	6,2	0,3	9
	7	11	1	6	4,4	0,8	6	15	2	6
	10	12	1	9	8	1	9	7	1	9
	15	15	1	9	12	1	9	15	1	9
	20	8	1	9	13	1	6	22	2	5

		Blind								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	1,21E+03	9E+01	3	1,4E+03	1E+02	3	1,6E+03	1E+02	3
	5	3,1E+03	5E+02	8	1,9E+03	3E+02	9	3,3E+03	4E+02	9
	7	1,4E+03	3E+02	9	8,8E+03	7E+02	9	1,42E+04	9E+02	9
	10	2E+03	1E+03	9	2E+03	1E+03	9	8E+03	2E+03	9
	15	9E+03	2E+03	9	1,0E+04	2E+03	9	9E+03	2E+03	9
	20	6E+02	6E+02	9	5E+03	2E+03	9	6E+03	2E+03	9
NOX	0	8,6E+02	8E+01	3	1,12E+03	9E+01	3	9,9E+02	8E+01	3
	5	3,1E+04	2E+03	8	3,0E+04	1E+03	9	3,9E+04	5E+03	6
	7	3,9E+04	5E+03	6	5,0E+04	5E+03	6	5,2E+04	6E+03	6
	10	1,4E+04	3E+03	9	2,4E+04	4E+03	9	5,3E+04	6E+03	9
	15	5,0E+04	6E+03	9	7,1E+04	7E+03	9	4,5E+04	5E+03	9
	20	4,2E+04	5E+03	9	4,4E+04	5E+03	9	4,3E+04	5E+03	9
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,30	0,02	3	0,34	0,02	3	0,38	0,02	3
	5	0,8	0,1	8	0,5	0,1	9	0,8	0,1	9
	7	0,3	0,1	9	2,1	0,2	9	3,5	0,2	9
	10	0,4	0,3	9	0,6	0,3	9	1,9	0,5	9
	15	2,2	0,6	9	2,5	0,6	9	2,2	0,6	9
	20	0,1	0,1	9	1,2	0,4	9	1,5	0,5	9
NOX	0	0,21	0,02	3	0,273	0,021	3	0,242	0,020	3
	5	7,6	0,4	8	7,4	0,3	9	10	1	6
	7	10	1	6	12	1	6	13	1	6
	10	3,5	0,7	9	5,9	0,9	9	13	1	9
	15	12	1	9	17	2	9	11	1	9
	20	10	1	9	11	1	9	10	1	9



Der blev set bort fra ekstrakt #3, da dette var kontamineret med uønsket bakterier.

		Blå PEM(1) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	5,1E+02	6E+01	3	6,1E+02	6E+01	3	6,3E+02	6E+01	3
	5	7,5E+03	7E+02	9	1,35E+04	9E+02	9	2,9E+04	1E+03	8
	7	1,47E+04	9E+02	9	2,5E+04	1E+03	9	1,00E+04	8E+02	9
	10	1,6E+04	1E+03	8	1,02E+04	8E+02	7	7,6E+04	7E+03	6
	15	2,1E+04	1E+03	9	1,2E+04	3E+03	6	2,9E+04	2E+03	7
	20	1,7E+05	1E+04	5	9,3E+04	8E+03	6	1,9E+05	1E+04	6
NOX	0	9,3E+02	8E+01	3	8,9E+02	8E+01	3	1,01E+03	8E+01	3
	5	6,5E+03	6E+02	9	9,97E+03	8E+02	9	1,31E+05	9E+03	6
	7	1,9E+04	1E+03	9	2,2E+04	1E+03	9	1,35E+05	9E+03	6
	10	2,3E+04	1E+03	8	1,28E+04	9E+02	7	2,5E+05	1E+04	6
	15	1,7E+04	1E+03	9	1,5E+04	3E+03	6	1,40E+05	9E+03	5
	20	4,8E+04	5E+03	6	3,5E+04	5E+03	6	3,1E+05	1E+04	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,13	0,01	3	0,15	0,02	3	0,15	0,02	3
	5	1,8	0,2	9	3,3	0,2	9	5,0	0,3	8
	7	3,6	0,2	9	6,1	0,3	9	2,4	0,2	9
	10	3,8	0,3	8	2,5	0,2	7	18	2	6
	15	5,1	0,3	9	3,0	0,7	6	7,1	0,4	7
	20	4,1	2	5	2,3	2	6	4,6	3	6
NOX	0	0,08	0,01	3	0,07	0,01	3	0,08	0,01	3
	5	0,5	0,1	9	0,8	0,1	9	10,9	0,7	6
	7	1,6	0,1	9	1,8	0,1	9	11,2	0,8	6
	10	1,9	0,1	8	1,1	0,1	7	2,1	1	6
	15	1,4	0,1	9	1,3	0,3	6	11,7	0,8	5
	20	4,0	0,4	6	2,9	0,4	6	2,6	1	6

Der blev set bort fra enkelte tællinger af P17, da der totalt blev talt mindre end 15 kolonier.

		Blind								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	7,5E+02	7E+01	3	9,9E+02	8E+01	3	4,9E+02	6E+01	3
	5	1,3E+03	3E+02	9	2,3E+03	6E+02	7	1,1E+03	3E+02	9
	7	2,0E+03	3E+02	9	1,0E+03	2E+02	9	1,5E+03	3E+02	9
	10	1,2E+03	9E+02	6	7E+02	2E+02	8	4,0E+03	5E+02	9
	15	7,5E+03	7E+02	9	3,9E+03	5E+02	8	6,8E+03	6E+02	9
	20	8,6E+03	7E+02	9	1,04E+04	8E+02	9	8,7E+03	7E+02	9
NOX	0	7,1E+02	7E+01	3	5,6E+02	6E+01	3	6,2E+02	6E+01	3
	5	1,27E+04	9E+02	9	1,8E+04	2E+03	7	7,4E+03	7E+02	9
	7	1,7E+04	1E+03	8	1,9E+04	1E+03	8	2,4E+04	1E+03	9
	10	1,3E+04	3E+03	6	1,34E+04	9E+02	8	2,0E+04	1E+03	9
	15	2,7E+04	4E+03	6	3,7E+04	6E+03	5	6,4E+04	6E+03	6
	20	6,4E+04	6E+03	6	6,8E+04	6E+03	6	6,1E+04	6E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,18	0,02	3	0,24	0,02	3	0,12	0,01	3
	5	0,31	0,07	9	0,6	0,1	7	0,28	0,06	9
	7	0,48	0,08	9	0,25	0,06	9	0,37	0,07	9
	10	0,3	0,2	6	0,18	0,05	8	1,0	0,1	9
	15	1,8	0,2	9	1,0	0,1	8	1,7	0,2	9
	20	2,1	0,2	9	2,5	0,2	9	2,1	0,2	9
NOX	0	0,06	0,01	3	0,05	0,01	3	0,05	0,01	3
	5	1,06	0,07	9	1,5	0,1	7	0,62	0,06	9
	7	1,4	0,1	8	1,6	0,1	8	2,0	0,1	9
	10	1,1	0,2	6	1,12	0,08	8	1,68	0,09	9
	15	2,3	0,3	6	3,0	0,5	5	5,4	0,5	6
	20	5,4	0,5	6	5,7	0,5	6	5,1	0,5	6

### H.1.3 Ekstraktion med en naturlig population

PEX og blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale blev ved S/V forhold på 0,5 cm<sup>-1</sup> ekstraheret samme med en naturlig bakteriepopulation. Ekstraktionen forløb over 20 døgn ved 10°C uden omrystning. Væksten af den naturlige population blev fulgt ved bestemmelse af kimtal på R<sub>2</sub>A dag 0, 5, 7, 10, 15, 20 efter forsøgets start. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved 25°C i 14 døgn. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne pasteuriseret, podet med P17 og NOX og inkuberet ved 15°C. Væksten af P17 og NOX blev fulgt ved bestemmelse af kimtal på R<sub>2</sub>A dag 20, 25, 27,30, 35, 40 efter forsøgets start. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved 25°C i to-tre døgn. PEX og blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale blev undersøgt i to forsøg, hvorfor hvert materiale har egne blindværdier.

Der blev set bort fra ekstrakt #2 under AOC-bestemmelsen på grund af afvigende høje NOX værdier.

		PEX S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>											
Kimtal	Dag	#1			#2			#3					
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N			
Naturlig Population	0	1,3E+01	9E+00	3	0E+00	0E+00	3	1,3E+01	9E+00	3			
	5	2E+02	1E+02	9	0E+00	0E+00	9	6E+01	6E+01	9			
	7	2,0E+03	3E+02	9	1,9E+03	3E+02	9	9,8E+03	8E+02	9			
	10	4,1E+03	5E+02	3	5,3E+03	6E+02	3	4,8E+03	6E+02	3			
	15	2,4E+04	1E+03	5	2,6E+04	1E+03	6	3,0E+04	1E+03	6			
20	4,0E+04	2E+03	7	7,8E+04	7E+03	6	4,9E+04	2E+03	8				
Kimtal	Dag	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N			
P17	20	6,6E+02	7E+01	3	3,5E+02	5E+01	3	2,8E+02	7E+01	1			
	25	1,27E+04	9E+02	9	2,0E+04	1E+03	9	8,3E+03	7E+02	9			
	27	1,6E+04	1E+03	9	2,4E+04	1E+03	9	2,0E+04	1E+03	9			
	30	1,7E+04	1E+03	9	2,7E+04	1E+03	9	2,2E+04	1E+03	9			
	35	1,49E+04	9E+02	9	2,9E+04	1E+03	9	2,8E+04	1E+03	8			
40	2,0E+04	1E+03	9	3,0E+04	1E+03	9	2,2E+04	1E+03	8				
NOX	20	7,1E+02	7E+01	3	3,5E+02	5E+01	3	3,8E+02	9E+01	1			
	25	2,4E+04	1E+03	9	4,5E+04	5E+03	6	1,35E+04	9E+02	9			
	27	3,2E+04	1E+03	9	6,5E+04	6E+03	6	2,2E+04	1E+03	9			
	30	3,0E+04	1E+03	9	6,4E+04	6E+03	6	2,9E+04	1E+03	9			
	35	3,0E+04	1E+03	9	6,1E+04	6E+03	6	5,5E+04	7E+03	5			
40	2,7E+04	1E+03	9	7,1E+04	7E+03	6	3,0E+04	2E+03	8				
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N			
P17	20	0,16	0,02	3	0,09	0,01	3	0,07	0,02	1			
	25	3,1	0,2	9	4,9	0,3	9	2,0	0,2	9			
	27	3,9	0,2	9	5,9	0,3	9	5,0	0,3	9			
	30	4,1	0,2	9	6,7	0,3	9	5,3	0,3	9			
	35	3,6	0,2	9	7,0	0,3	9	6,8	0,3	8			
40	4,8	0,3	9	7,2	0,3	9	5,3	0,3	8				
NOX	20	0,06	0,01	3	0,029	0,004	3	0,03	0,01	1			
	25	2,0	0,1	9	3,8	0,4	6	1,12	0,07	9			
	27	2,7	0,1	9	5,4	0,5	6	1,9	0,1	9			
	30	2,5	0,1	9	5,4	0,5	6	2,4	0,1	9			
	35	2,5	0,1	9	5,1	0,5	6	4,6	0,6	5			
40	2,3	0,1	9	5,9	0,5	6	2,5	0,1	8				

		Blind											
Kimtal	Dag	#1			#2			#3					
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N			
Naturlig Population	0	7E+00	7E+00	3	7E+00	7E+00	3	7E+00	7E+00	3			
	5	2E+02	1E+02	9	1,2E+02	8E+01	9	2E+02	1E+02	9			
	7	9E+02	2E+02	9	2,0E+03	3E+02	9	4E+02	1E+02	9			
	10	1,42E+03	9E+01	6	7,0E+03	7E+02	3	8,3E+03	7E+02	3			
	15	1,19E+04	9E+02	6	3,0E+04	1E+03	6	3,8E+03	5E+02	5			
20	1,9E+04	1E+03	9	3,8E+04	2E+03	8	7,2E+03	7E+02	9				
Kimtal	Dag	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N			
P17	20	5,6E+02	6E+01	3	4,1E+02	5E+01	3	4,9E+02	6E+01	3			
	25	3,2E+03	4E+02	9	3,9E+03	5E+02	9	4,2E+03	5E+02	9			
	27	5,9E+03	6E+02	9	5,8E+03	6E+02	9	5,9E+03	6E+02	9			
	30	6,1E+03	7E+02	8	6,8E+03	6E+02	9	6,8E+03	6E+02	9			
	35	6,7E+03	6E+02	9	5,2E+03	6E+02	9	6,8E+03	6E+02	9			
40	6,3E+03	6E+02	9	6,4E+03	6E+02	9	6,1E+03	6E+02	9				
NOX	20	4,7E+02	6E+01	3	3,7E+02	5E+01	3	4,6E+02	6E+01	3			
	25	2,6E+04	1E+03	9	2,4E+04	1E+03	9	1,24E+04	9E+02	9			
	27	3,1E+04	1E+03	9	2,5E+04	1E+03	9	2,0E+04	1E+03	9			
	30	3,4E+04	2E+03	8	2,8E+04	1E+03	9	3,6E+04	5E+03	6			
	35	2,8E+04	1E+03	9	2,4E+04	1E+03	9	4,1E+04	5E+03	6			
40	3,0E+04	1E+03	9	2,8E+04	1E+03	9	3,4E+04	1E+03	9				
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N			
P17	20	0,14	0,01	3	0,10	0,01	3	0,12	0,01	3			
	25	0,8	0,1	9	1,0	0,1	9	1,0	0,1	9			
	27	1,5	0,1	9	1,4	0,1	9	1,5	0,1	9			
	30	1,5	0,2	8	1,7	0,2	9	1,7	0,2	9			
	35	1,6	0,2	9	1,3	0,1	9	1,7	0,2	9			
40	1,5	0,2	9	1,6	0,2	9	1,5	0,1	9				
NOX	20	0,039	0,005	3	0,031	0,004	3	0,038	0,005	3			
	25	2,1	0,1	9	2,0	0,1	9	1,04	0,07	9			
	27	2,6	0,1	9	2,1	0,1	9	1,69	0,09	9			
	30	2,8	0,1	8	2,3	0,1	9	3,0	0,4	6			
	35	2,3	0,1	9	2,0	0,1	9	3,4	0,4	6			
40	2,5	0,1	9	2,3	0,1	9	2,8	0,1	9				

Der blev set bort fra ekstrakt #1, da dette ved en fejl ikke blev podet med den naturlige population dag 0.

		Blå PEM <sub>(1)</sub> S/V=0,5 cm <sup>3</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig Population	0	0E+00	0E+00	3	7E+00	7E+00	3	3E+01	1E+01	3
	5	0E+00	0E+00	9	7E+01	2E+01	9	2,9E+02	4E+01	9
	7	0E+00	0E+00	9	5,5E+03	6E+02	6	1,35E+04	9E+02	6
	10	0E+00	0E+00	9	2E+04	1E+03	6	1,1E+04	1E+03	5
	15	0E+00	0E+00	9	2,9E+04	2E+03	8	3,5E+04	1E+03	9
	20	0E+00	0E+00	9	4,2E+04	2E+03	5	5,9E+04	2E+03	5
Kimtal	Dag	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	20	8,5E+02	8E+01	3	9,2E+02	8E+01	3	6,9E+02	7E+01	3
	25	1,6E+05	1E+04	6	1,6E+04	1E+03	9	4,6E+03	5E+02	9
	27	1,6E+05	1E+04	6	1,18E+04	9E+02	7	5,5E+03	6E+02	9
	30	1,35E+05	9E+03	9	1,6E+04	3E+03	9	6,1E+03	2E+03	6
	35	1,22E+05	9E+03	9	2,1E+04	1E+03	9	7,1E+03	7E+02	9
	40	7,7E+04	7E+03	6	2,3E+04	1E+03	9	3,0E+03	4E+02	9
NOX	20	7,9E+02	7E+01	3	7,9E+02	7E+01	3	4,1E+02	5E+01	3
	25	4,7E+04	5E+03	6	8,2E+04	7E+03	6	4,2E+04	5E+03	6
	27	5,0E+04	5E+03	6	9E+04	1E+04	4	3,7E+04	5E+03	6
	30	5,3E+04	6E+03	9	9,3E+04	7E+03	9	4,2E+04	5E+03	6
	35	4,6E+04	5E+03	9	5,2E+04	6E+03	6	3,8E+04	2E+03	9
	40	3,9E+04	5E+03	6	6,4E+04	6E+03	6	2,7E+04	1E+03	9
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	20	0,21	0,02	3	0,22	0,02	3	0,17	0,02	3
	25	40	2	6	4,0	0,2	9	1,1	0,1	9
	27	40	2	6	2,9	0,2	7	1,3	0,1	9
	30	33	2	9	4,0	0,8	9	1,5	0,5	6
	35	30	2	9	5,1	0,3	9	1,7	0,2	9
	40	19	2	6	5,5	0,3	9	0,7	0,1	9
NOX	20	0,07	0,01	3	0,07	0,01	3	0,034	0,004	3
	25	3,9	0,4	6	6,8	0,6	6	3,5	0,4	6
	27	4,1	0,5	6	7,3	1,0	4	3,1	0,4	6
	30	4,5	0,5	9	7,8	0,6	9	3,5	0,4	6
	35	3,8	0,4	9	4,3	0,5	6	3,2	0,1	9
	40	3,2	0,4	6	5,4	0,5	6	2,3	0,1	9

		Blind								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig Population	0	7E+00	7E+00	3	7E+00	7E+00	3	7E+00	7E+00	3
	5	4E+01	1E+01	9	1,5E+02	4E+01	8	4E+01	2E+01	9
	7	3,5E+02	5E+01	9	1,9E+03	1E+02	9	3,7E+02	5E+01	9
	10	2,4E+03	1E+02	8	9,9E+02	9E+01	8	2,9E+03	2E+02	8
	15	4,3E+04	2E+03	9	1,3E+04	1E+03	7	1,00E+04	8E+02	9
	20	4,8E+04	2E+03	6	3,0E+04	2E+03	5	3,4E+04	2E+03	4
Kimtal	Dag	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	20	9,5E+02	8E+01	3	1,2E+03	9E+01	3	1,05E+03	8E+01	3
	25	4,9E+03	5E+02	9	7,4E+03	7E+02	9	1,7E+04	1E+03	9
	27	6,6E+03	8E+02	8	7,7E+03	7E+02	9	1,7E+04	1E+03	9
	30	1,0E+04	2E+03	6	7,0E+03	6E+02	9	1,39E+04	9E+02	9
	35	4,6E+03	5E+02	9	6,4E+03	6E+02	9	1,09E+04	8E+02	9
	40	5,8E+03	6E+02	9	5,5E+03	6E+02	9	1,15E+04	8E+02	9
NOX	20	6,7E+02	7E+01	3	6,9E+02	7E+01	3	6,0E+02	6E+01	3
	25	2,1E+04	1E+03	9	5,0E+04	6E+03	6	2,3E+04	1E+03	9
	27	3,1E+04	2E+03	8	6,8E+04	6E+03	6	2,6E+04	1E+03	9
	30	3,5E+04	5E+03	6	6,0E+04	6E+03	6	3,4E+04	1E+03	9
	35	3,6E+04	1E+03	9	7,8E+04	7E+03	6	3,5E+04	1E+03	9
	40	3,4E+04	1E+03	9	4,9E+04	5E+03	6	3,2E+04	1E+03	9
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	20	0,23	0,02	3	0,28	0,02	3	0,26	0,02	3
	25	1,2	0,1	9	1,8	0,2	9	4,1	0,2	9
	27	1,6	0,2	8	1,9	0,2	9	4,2	0,2	9
	30	2,5	0,6	6	1,7	0,2	9	3,4	0,2	9
	35	1,1	0,1	9	1,6	0,2	9	2,7	0,2	9
	40	1,4	0,1	9	1,3	0,1	9	2,8	0,2	9
NOX	20	0,06	0,01	3	0,06	0,01	3	0,05	0,01	3
	25	1,74	0,09	9	4,2	0,5	6	1,9	0,1	9
	27	2,6	0,1	8	5,7	0,5	6	2,2	0,1	9
	30	2,9	0,4	6	5,0	0,5	6	2,9	0,1	9
	35	3,0	0,1	9	6,5	0,6	6	2,9	0,1	9
	40	2,9	0,1	9	4,1	0,5	6	2,7	0,1	9

## H.2 Desinfektion af testmateriale (jævnfør kapitel 5)

Materiale blev inden ekstraktionen enten desinficeret ved henstand i chlor-opløsning, ved pasteurisering eller ikke desinficeret. Efterfølgende blev materialet ekstraheret sammen med en naturlig bakteriepopulation. Undersøgelsen blev udført med dels med blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale og en lav chlor-koncentration og dels med sort PEM materiale og en høj chlor-koncentration.

### H.2.1 Blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale og lav chlor-koncentration

Undersøgelsen blev udført med blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale og en chlor-koncentration på 1 mg/L chlor. Materialet blev ekstraheret ved et S/V forhold på 1,0 cm<sup>-1</sup> over 20 døgn ved 10°C uden omrystning. Væksten af den naturlige population blev fulgt ved bestemmelse af kimtal på R<sub>2</sub>A dag 0, 5, 7, 10, 15, 20 efter podning. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved 25°C i 14 døgn.

		Blå PEM <sub>(1)</sub> S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> Desinficeret med ~1 mg/L chlor								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig population	0	1,7E+02	3E+01	3	2,8E+02	4E+01	3	2,2E+02	4E+01	3
	5	1,29E+04	9E+02	5	5,7E+03	8E+02	2	2,2E+04	1E+03	6
	7	1,8E+04	1E+03	9	1,17E+04	8E+02	9	4,7E+04	5E+03	6
	10	3,4E+04	5E+03	9	4,9E+04	5E+03	9	6,4E+04	6E+03	9
	15	1,5E+05	1E+04	8	6,3E+04	6E+03	9	6,2E+04	6E+03	9
	20	2,3E+05	1E+04	9	2,1E+05	1E+04	9	2,5E+05	1E+04	6

		Blå PEM <sub>(1)</sub> S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> Desinficeret ved pasteurisering								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig population	0	1,8E+02	3E+01	3	1,5E+02	3E+01	3	1,1E+02	3E+01	3
	5	6,8E+03	7E+02	4	1,6E+04	1E+03	5	5,4E+03	6E+02	6
	7	7,9E+04	8E+03	5	2,1E+04	1E+03	8	3,2E+04	4E+03	6
	10	5,9E+04	6E+03	9	6,9E+04	6E+03	9	4,6E+04	5E+03	9
	15	6,1E+04	6E+03	9	8,3E+04	7E+03	9	5,0E+04	5E+03	9
	20	2,7E+05	1E+04	9	1,7E+05	1E+04	9	1,9E+05	1E+04	6

Pladerne for ekstrakt #2 dag 7 gik tabt.

		Blå PEM <sub>(1)</sub> S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> Ingen desinfektion								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig population	0	6,6E+02	8E+01	2	7,2E+02	7E+01	3	5,7E+02	6E+01	3
	5	1,43E+04	9E+02	6	6,7E+04	7E+03	3	6,4E+04	7E+03	3
	7	9,6E+04	8E+03	6	-	-	0	5,7E+04	6E+03	6
	10	5,2E+04	6E+03	9	1,15E+05	8E+03	9	9E+04	1E+04	7
	15	9,2E+04	7E+03	9	9,1E+04	7E+03	9	1,32E+05	9E+03	9
	20	2,7E+05	1E+04	9	2,2E+05	1E+04	7	2,8E+05	1E+04	9

		Blind								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig population	0	3,6E+02	5E+01	3	1,9E+02	4E+01	3	1,9E+02	4E+01	3
	5	1,6E+04	1E+03	6	3,6E+03	5E+02	6	2,0E+03	1E+02	8
	7	6,6E+03	6E+02	9	1,34E+04	9E+02	9	6,0E+03	6E+02	9
	10	1,21E+04	9E+02	9	1,44E+04	9E+02	9	1,9E+04	1E+03	8
	15	3,1E+04	1E+03	7	1,8E+04	1E+03	9	1,19E+04	9E+02	6
	20	1,2E+05	1E+04	5	1,39E+05	9E+03	6	2,3E+05	1E+04	6

## H.2.2 Sort PEM materiale og høj chlor-koncentration

Undersøgelsen blev udført med sort PEM materiale og en chlor-koncentration på 22 mg/L chlor. Materialet blev ekstraheret ved et S/V forhold på 1,0 cm<sup>-1</sup> over 55 døgn ved 10°C under omrystning. Væksten af den naturlige population blev fulgt ved bestemmelse af kimalt på R<sub>2</sub>A dag 0, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55 efter podning. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved 25°C i 14 døgn.

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> Desinficeret med ~22 mg/L chlor								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig population	0	5,1E+02	6E+01	3	5,0E+02	6E+01	3	5,1E+02	6E+01	3
	5	6,3E+04	6E+03	6	5,8E+04	6E+03	6	3,7E+04	5E+03	6
	10	2,1E+05	1E+04	6	2,5E+05	4E+04	6	3,0E+05	4E+04	6
	20	7E+05	1E+05	4	6,2E+05	6E+04	6	9,6E+05	8E+04	6
	25	1,13E+06	8E+04	6	7,9E+05	7E+04	6	1,32E+06	9E+04	6
	30	1,08E+06	8E+04	6	1,02E+06	8E+04	6	1,8E+05	1E+04	9
	35	3,1E+05	4E+04	6	1,20E+06	9E+04	6	1,09E+05	8E+03	9
	40	1,14E+05	8E+03	9	2,2E+05	1E+04	9	1,13E+05	8E+03	9
	50	2,1E+05	1E+04	9	1,05E+05	8E+03	8	1,20E+05	8E+03	9
	55	2,9E+05	1E+04	6	1,4E+05	1E+04	4	1,43E+05	9E+03	6

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> Desinficeret ved pasteurisering								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig population	0	5,5E+02	6E+01	3	6,7E+02	7E+01	3	6,1E+02	6E+01	3
	5	8,3E+04	7E+03	6	8,7E+04	7E+03	6	2,0E+04	1E+03	9
	10	7,9E+05	7E+04	6	1,22E+06	9E+04	6	5,2E+05	6E+04	6
	20	6,0E+05	6E+04	6	7,9E+05	7E+04	6	1,45E+06	9E+04	6
	25	4,0E+05	5E+04	5	1,6E+05	1E+04	9	1,8E+05	1E+04	9
	30	9,97E+04	8E+03	9	7,7E+04	7E+03	9	2,6E+05	1E+04	8
	35	8,2E+04	7E+03	9	7,8E+04	7E+03	9	3,3E+05	1E+04	9
	40	8,9E+04	7E+03	9	4,1E+04	5E+03	9	4,3E+05	5E+04	6
	50	1,27E+05	9E+03	9	6,8E+04	6E+03	9	2,0E+05	1E+04	9
	55	1,5E+05	1E+04	6	8,3E+04	7E+03	6	1,8E+05	1E+04	6

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> Ingen desinfektion								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig population	0	1,05E+03	8,35E+01	3	1,01E+03	8,22E+01	3	9,07E+02	7,77E+01	3
	5	5,94E+04	6,00E+03	6	6,91E+04	6,47E+03	6	4,12E+04	5,00E+03	6
	10	7,33E+05	6,67E+04	6	4,86E+04	5,41E+03	9	2,73E+06	4,27E+05	3
	20	8,12E+04	1,11E+04	7	8,41E+04	7,11E+03	9	1,05E+05	7,92E+03	9
	25	9,07E+04	7,38E+03	9	1,09E+05	8,08E+03	9	1,35E+05	9,01E+03	9
	30	2,19E+05	1,37E+04	8	1,40E+05	9,17E+03	9	2,35E+05	1,19E+04	9
	35	2,20E+05	1,15E+04	9	1,58E+05	9,74E+03	9	3,03E+05	4,29E+04	6
	40	1,79E+05	1,04E+04	9	1,93E+05	1,08E+04	9	2,44E+05	1,21E+04	9
	50	2,52E+05	1,23E+04	9	1,62E+05	9,85E+03	9	2,25E+05	1,16E+04	9
	55	2,84E+05	1,31E+04	6	1,23E+05	8,64E+03	6	2,16E+05	1,14E+04	6

Pladerne for blindprøverne dag 50 gik tabt.

		Blind								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
Naturlig population	0	6,0E+02	6E+01	3	4,3E+02	5E+01	3	4,6E+02	6E+01	3
	5	1,33E+05	9E+03	6	2,5E+04	1E+03	9	1,8E+04	1E+03	9
	10	2,6E+05	4E+04	6	6,1E+04	7E+03	8	6,1E+04	6E+03	9
	20	3,2E+05	4E+04	6	8,6E+04	7E+03	9	6,7E+04	6E+03	9
	25	3,5E+05	1E+04	9	9,4E+04	8E+03	9	8,7E+04	7E+03	9
	30	3,3E+05	1E+04	9	1,03E+05	8E+03	9	7,5E+04	7E+03	9
	35	2,1E+05	1E+04	9	1,09E+05	8E+03	9	1,07E+05	8E+03	8
	40	1,7E+05	1E+04	9	2,3E+04	4E+03	9	3,6E+04	5E+03	9
	50	-	-	0	-	-	0	-	-	0
	55	1,9E+05	1E+04	6	6,5E+04	6E+03	6	6,1E+04	6E+03	6

### H.3 Sekventielle ekstraktioner (jævnfør kapitel 6)

Sort PEM materialer blev ekstraheret sekventielt ved at ekstrahere det enkelte sæt teststykker af flere omgange. Efter 1. ekstraktion blev teststykkerne overført til frisk testvand, hvor 2. ekstraktion forløb osv. Materialet blev ekstraheret i perioder på 15 døgn ved 10°C ved S/V forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup> både uden og under omrystning.

Efter materialet var taget op, blev de enkelte ekstrakter podet med P17 og inkuberet ved 15°C. Væksten af P17 blev fulgt ved bestemmelse af kimalt på R<sub>2</sub>A dag 0, 3, 5, 7, 10, 15, 20 (1. ekstraktion), 25 (2.-4. ekstraktion) efter podning. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved 25°C i to-tre døgn.

Der er set bort fra data for både P17 og NN, blot én af de to stammer udviste en afvigende vækstkurve. I tilfælde hvor alle tre vækstkurver afveg fra hinanden, er det valgt at bibeholde alle data.

#### H.3.1 1. ekstraktion

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup> -omrystning								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,1E+02	5E+01	3	4,07E+02	5E+01	3	2,2E+02	4E+01	3
	3	1,43E+05	9E+03	6	1,39E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6
	5	1,23E+05	9E+03	6	1,22E+05	9E+03	6	1,18E+05	8E+03	6
	7	1,15E+05	8E+03	6	1,15E+05	8E+03	6	1,5E+05	1E+04	6
	10	9,6E+04	8E+03	6	8,0E+04	7E+03	6	8,6E+04	7E+03	6
	15	9,4E+04	8E+03	6	7,9E+04	7E+03	5	7,8E+04	7E+03	6
	20	7,9E+04	7E+03	6	6,4E+04	6E+03	6	5,9E+04	6E+03	6
NN	0	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3
	3	7E+03	2E+03	6	4E+03	2E+03	6	1,2E+04	3E+03	6
	5	4,0E+04	5E+03	6	4,8E+04	5E+03	6	5,0E+04	5E+03	6
	7	4,2E+04	5E+03	6	4,4E+04	5E+03	6	5,2E+04	6E+03	6
	10	2,4E+04	4E+03	6	5,5E+04	6E+03	6	4,4E+04	5E+03	6
	15	2,7E+04	4E+03	6	4,4E+04	5E+03	5	5,5E+04	6E+03	6
	20	3,5E+04	5E+03	6	5,0E+04	5E+03	6	4,0E+04	5E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,07	0,01	3	0,10	0,01	3	0,05	0,01	3
	3	35	2	6	34	2	6	37	2	6
	5	30	2	6	30	2	6	29	2	6
	7	28	2	6	28	2	6	37	2	6
	10	23	2	6	20	2	6	21	2	6
	15	23	2	6	19	2	5	19	2	6
	20	19	2	6	16	2	6	14	1	6

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> -omrystning								
Kimalt	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,7E+02	5E+01	3	3,8E+02	5E+01	3	4,0E+02	5E+01	3
	3	1,19E+05	8E+03	6	1,6E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	5
	5	1,5E+05	1E+04	6	1,25E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6
	7	1,5E+05	1E+04	6	1,29E+05	9E+03	6	1,42E+05	9E+03	6
	10	1,18E+05	8E+03	6	8,5E+04	7E+03	6	1,26E+05	9E+03	6
	15	1,24E+05	9E+03	6	9,4E+04	8E+03	4	6,0E+04	6E+03	6
	20	9,3E+04	7E+03	6	8,1E+04	7E+03	6	6,2E+04	6E+03	6
NN	0	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3	0,00E+00	0E+00	3
	3	5E+03	2E+03	6	7E+03	2E+03	6	6,88E+03	2E+03	5
	5	5,5E+04	6E+03	6	3,8E+04	5E+03	6	5,5E+04	6E+03	6
	7	6,8E+04	6E+03	6	4,3E+04	5E+03	6	3,6E+04	5E+03	6
	10	5,8E+04	6E+03	6	3,3E+04	4E+03	6	4,4E+04	5E+03	6
	15	5,9E+04	6E+03	6	2,8E+04	4E+03	4	4,0E+04	5E+03	6
	20	4,8E+04	5E+03	6	4,1E+04	5E+03	6	4,7E+04	5E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,09	0,01	3	0,09	0,01	3	0,10	0,01	3
	3	29	2	6	38	2	6	44	3	5
	5	37	2	6	31	2	6	38	2	6
	7	37	2	6	31	2	6	35	2	6
	10	29	2	6	21	2	6	31	2	6
	15	30	2	6	23	2	4	15	1	6
	20	23	2	6	20	2	6	15	1	6

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup> +omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,5E+02	5E+01	3	4,3E+02	5E+01	3	3,6E+02	5E+01	3
	3	1,6E+05	1E+04	6	1,19E+05	8E+03	6	1,40E+05	9E+03	6
	5	1,8E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6
	7	2,0E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6
	10	1,7E+05	1E+04	6	1,46E+05	9E+03	6	1,47E+05	9E+03	6
	15	1,7E+05	1E+04	6	1,19E+05	9E+03	6	1,1E+05	1E+04	4
20	1,41E+05	9E+03	6	1,19E+05	8E+03	6	1,15E+05	8E+03	6	
NN	0	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3
	3	6E+03	2E+03	6	5E+03	2E+03	6	5E+03	2E+03	6
	5	3,0E+04	4E+03	6	3,8E+04	5E+03	6	2,8E+04	4E+03	6
	7	3,7E+04	5E+03	6	3,8E+04	5E+03	6	3,3E+04	4E+03	6
	10	3,3E+04	4E+03	6	6,0E+04	6E+03	6	3,4E+04	5E+03	6
	15	3,0E+04	4E+03	6	6,2E+04	6E+03	6	3,2E+04	7E+03	4
20	3,4E+04	5E+03	6	6,5E+04	6E+03	6	4,5E+04	5E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,08	0,01	3	0,11	0,01	3	0,09	0,01	3
	3	39	2	6	29	2	6	34	2	6
	5	44	3	6	38	2	6	42	2	6
	7	48	3	6	38	2	6	37	2	6
	10	41	2	6	36	2	6	36	2	6
	15	42	2	6	29	2	6	26	3	4
20	34	2	6	29	2	6	28	2	6	

Der blev set bort fra ekstrakt #1, da vækstkurven for NN afveg fra de to øvrige replikater.

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> +omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	4,4E+02	5E+01	3	4,5E+02	5E+01	3	4,1E+02	5E+01	3
	3	2,1E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	5	2,0E+05	1E+04	6
	5	2,2E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6	2,4E+05	1E+04	6
	7	2,0E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6	2,4E+05	1E+04	6
	10	1,9E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6
	15	1,35E+05	9E+03	6	1,9E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6
20	1,20E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	5	
NN	0	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3
	3	2,1E+05	1E+04	6	1,1E+04	3E+03	5	8E+03	2E+03	6
	5	3,9E+05	5E+04	3	3,6E+04	5E+03	6	3,5E+04	5E+03	6
	7	3,1E+05	5E+04	3	4,1E+04	5E+03	6	4,0E+04	5E+03	6
	10	3,5E+05	5E+04	3	4,3E+04	5E+03	6	3,0E+04	4E+03	6
	15	2,9E+05	1E+04	6	3,9E+04	5E+03	6	3,2E+04	4E+03	6
20	2,3E+05	1E+04	6	3,6E+04	5E+03	6	3,9E+04	5E+03	3	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,11	0,01	3	0,11	0,01	3	0,10	0,01	3
	3	50	3	6	41	3	5	48	3	6
	5	54	3	6	46	3	6	57	3	6
	7	48	3	6	37	2	6	58	3	6
	10	46	3	6	41	2	6	52	3	6
	15	33	2	6	46	3	6	41	2	6
20	29	2	6	36	2	6	42	3	5	



Der blev set bort fra blindprøve #2, da vækstkurven for NN afveg fra de to øvrige replikater

		Blind								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,9E+02	5E+01	3	4,5E+02	5E+01	3	4,9E+02	6E+01	3
	3	8,6E+03	7E+02	9	1,9E+04	1E+03	9	5,9E+04	6E+03	6
	5	2,2E+04	1E+03	9	2,1E+04	1E+03	9	6,2E+04	6E+03	6
	7	2,5E+04	1E+03	9	2,2E+04	1E+03	9	5,8E+04	6E+03	6
	10	2,3E+04	1E+03	9	2,2E+04	1E+03	9	4,7E+04	5E+03	6
	15	2,2E+04	1E+03	9	2,1E+04	1E+03	6	4,5E+04	5E+03	6
20	2,3E+04	1E+03	9	2,3E+04	1E+03	9	4,1E+04	2E+03	9	
NN	0	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3
	3	1,8E+04	1E+03	9	3,3E+05	1E+04	6	4,6E+04	5E+03	6
	5	1,08E+05	8E+03	6	2,0E+05	1E+04	6	9,2E+04	7E+03	6
	7	1,24E+05	9E+03	6	3,5E+05	1E+04	6	1,01E+05	8E+03	6
	10	1,21E+05	9E+03	6	2,3E+05	1E+04	6	8,8E+04	7E+03	6
	15	9,9E+04	8E+03	6	9,3E+04	2E+04	3	8,1E+04	7E+03	6
20	7E+04	2E+04	3	9,5E+04	8E+03	6	9,6E+04	8E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,09	0,01	3	0,11	0,01	3	0,12	0,01	3
	3	2,1	0,2	9	4,5	0,3	9	14,3	1,5	6
	5	5,5	0,3	9	5,0	0,3	9	15,1	1,5	6
	7	6,0	0,3	9	5,4	0,3	9	14,0	1,4	6
	10	5,6	0,3	9	5,3	0,3	9	11,4	1,3	6
	15	5,3	0,3	9	5,2	0,3	6	10,9	1,3	6
20	5,7	0,3	9	5,7	0,3	9	10,0	0,4	9	

### H.3.2 2. ekstraktion

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup> -omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,6E+02	5E+01	3	3,5E+02	5E+01	3	2,9E+02	4E+01	3
	3	9,7E+04	8E+03	3	1,29E+05	9E+03	3	9,9E+04	8E+03	3
	5	7,8E+04	7E+03	6	1,18E+05	8E+03	6	1,03E+05	8E+03	5
	7	6,4E+04	6E+03	6	1,0E+05	1E+04	4	1,10E+05	8E+03	6
	10	7,5E+04	7E+03	4	9,3E+04	7E+03	6	1,04E+05	8E+03	6
	15	7,3E+04	7E+03	6	1,12E+05	8E+03	6	7,2E+04	7E+03	6
25	4,4E+04	5E+03	6	7,0E+04	7E+03	6	7,2E+04	7E+03	6	
NN	0	1,3E+01	9E+00	3	7E+00	7E+00	3	1,3E+01	9E+00	3
	3	2,4E+04	4E+03	3	1,1E+04	3E+03	3	1,7E+04	3E+03	3
	5	4,8E+04	5E+03	6	2,8E+04	4E+03	6	3,9E+04	5E+03	5
	7	5,0E+04	5E+03	6	5,4E+04	9E+03	4	4,7E+04	5E+03	6
	10	4,3E+04	5E+03	4	3,5E+04	5E+03	6	4,2E+04	5E+03	6
	15	3,9E+04	5E+03	6	4,2E+04	5E+03	6	4,2E+04	5E+03	6
25	5,0E+04	6E+03	6	5,0E+04	5E+03	6	4,0E+04	5E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,09	0,01	3	0,09	0,01	3	0,07	0,01	3
	3	24	2	3	31	2	3	24	2	3
	5	19	2	6	29	2	6	25	2	5
	7	16	2	6	25	3	4	27	2	6
	10	18	2	4	23	2	6	25	2	6
	15	18	2	6	27	2	6	17	2	6
25	11	1	6	17	2	6	18	2	6	

Der blev set bort fra ekstrakt #1, da vækstkurven for NN afveg fra de to øvrige replikater.

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> -omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,7E+02	4E+01	3	3,1E+02	5E+01	3	3,8E+02	9E+01	1
	3	1,4E+05	1E+04	2	9,0E+04	8E+03	3	1,4E+05	1E+04	3
	5	1,37E+05	9E+03	6	1,1E+05	1E+04	5	1,38E+05	9E+03	6
	7	7E+04	2E+04	3	9,4E+04	8E+03	6	1,1E+05	1E+04	4
	10	8,8E+04	7E+03	6	8,4E+04	7E+03	6	1,28E+05	9E+03	6
	15	6,7E+04	6E+03	6	9,6E+04	8E+03	6	1,28E+05	9E+03	6
25	2,6E+04	4E+03	6	7,8E+04	7E+03	6	6,8E+04	6E+03	6	
NN	0	7E+00	7E+00	3	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	1
	3	4E+03	2E+03	2	6E+03	2E+03	3	6E+03	2E+03	3
	5	1,8E+05	1E+04	6	3,0E+04	5E+03	5	4,4E+04	5E+03	6
	7	1,7E+05	3E+04	3	3,2E+04	4E+03	6	2,5E+04	6E+03	4
	10	1,9E+05	1E+04	6	3,6E+04	5E+03	6	3,1E+04	4E+03	6
	15	2,5E+05	1E+04	6	4,1E+04	5E+03	6	3,9E+04	5E+03	6
25	2,0E+05	1E+04	6	4,4E+04	5E+03	6	3,8E+04	5E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,07	0,01	3	0,07	0,01	3	0,09	0,02	1
	3	34	3	2	22	2	3	34	2	3
	5	33	2	6	27	2	5	34	2	6
	7	18	5	3	23	2	6	27	3	4
	10	22	2	6	21	2	6	31	2	6
	15	16	2	6	23	2	6	31	2	6
25	6	1	6	19	2	6	17	2	6	

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup> +omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,7E+02	5E+01	3	4,1E+02	5E+01	3	3,7E+02	5E+01	3
	3	1,6E+05	1E+04	3	2,6E+05	1E+04	3	2,4E+05	1E+04	3
	5	1,6E+05	1E+04	6	1,30E+05	9E+03	6	2,1E+05	1E+04	6
	7	1E+05	9E+03	6	1,01E+05	8E+03	6	2,1E+05	1E+04	6
	10	1E+05	8E+03	5	1,10E+05	8E+03	6	1,9E+05	1E+04	6
	15	1E+05	9E+03	6	1,19E+05	9E+03	6	2,1E+05	1E+04	6
25	1E+05	8E+03	6	1,21E+05	9E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	
NN	0	0E+00	0E+00	3	1,3E+01	9E+00	3	0E+00	0E+00	3
	3	9E+03	2E+03	3	1,8E+04	3E+03	3	7,5E+04	7E+03	3
	5	2,4E+04	4E+03	6	6,1E+04	6E+03	6	9,5E+04	8E+03	6
	7	3,3E+04	4E+03	6	6,1E+04	6E+03	6	9,6E+04	8E+03	6
	10	2,3E+04	4E+03	5	6,0E+04	6E+03	6	1,80E+05	3E+04	3
	15	2,3E+04	4E+03	6	6,4E+04	6E+03	6	9,1E+04	7E+03	6
25	3,0E+04	4E+03	6	6,4E+04	6E+03	6	9,4E+04	8E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,09	0,01	3	0,10	0,01	3	0,09	0,01	3
	3	39	3	3	64	3	3	59	3	3
	5	38	2	6	32	2	6	52	3	6
	7	31	2	6	25	2	6	52	3	6
	10	25	2	5	27	2	6	46	3	6
	15	32	2	6	29	2	6	51	3	6
25	25	2	6	30	2	6	44	3	6	

Der blev set bort fra ekstrakt #1, da vækstkurven for P17 afveg fra de to øvrige replikater

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> +omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,7E+02	5E+01	3	3,8E+02	5E+01	3	2,9E+02	4E+01	3
	3	2,8E+04	1E+03	9	2,1E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6
	5	3,8E+04	2E+03	9	2,0E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6
	7	3,8E+04	5E+03	6	2,0E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6
	10	3,1E+04	4E+03	6	2,0E+05	1E+04	5	1,8E+05	1E+04	6
	15	3,8E+04	5E+03	6	2,1E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
25	2,4E+04	4E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6	
NN	0	1,3E+01	9E+00	3	7E+00	7E+00	3	1,3E+01	9E+00	3
	3	9,2E+04	7E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	2E+03	1E+03	6
	5	9,5E+04	8E+03	6	2,8E+05	4E+04	3	2,2E+04	4E+03	6
	7	2,1E+05	1E+04	6	3,1E+05	5E+04	3	3,9E+04	5E+03	6
	10	1,35E+05	9E+03	6	2,5E+05	5E+04	2	3,0E+04	4E+03	6
	15	1,39E+05	9E+03	6	3,7E+05	5E+04	3	2,7E+04	4E+03	6
25	1,26E+05	9E+03	6	3,1E+05	5E+04	3	7,7E+04	7E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,09	0,01	3	0,09	0,01	3	0,07	0,01	3
	3	6,8	0,3	9	50	3	6	41	2	6
	5	9,2	0,4	9	50	3	6	42	2	6
	7	9	1	6	48	3	6	39	2	6
	10	8	1	6	48	3	5	43	3	6
	15	9	1	6	50	3	6	45	3	6
25	6	1	6	44	3	6	49	3	6	

		Blind								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,3E+02	5E+01	3	3,8E+02	5E+01	3	3,9E+02	5E+01	3
	3	2,3E+04	1E+03	9	7,3E+03	7E+02	9	1,5E+04	1E+03	9
	5	4,8E+04	5E+03	6	1,35E+04	9E+02	6	2,8E+04	1E+03	9
	7	4,7E+04	5E+03	6	1,14E+04	8E+02	9	2,7E+04	1E+03	9
	10	6,1E+04	6E+03	6	1,29E+04	9E+02	9	2,2E+04	1E+03	9
	15	5,8E+04	6E+03	6	1,21E+04	9E+02	9	2,2E+04	1E+03	9
25	6,1E+04	6E+03	6	1,5E+04	1E+03	9	2,2E+04	1E+03	9	
NN	0	7E+00	7E+00	3	0E+00	0E+00	3	1,3E+01	9E+00	3
	3	1,27E+04	9E+02	9	1,9E+04	1E+03	9	1,30E+04	9E+02	9
	5	8,5E+04	7E+03	6	7,3E+04	2E+04	3	7,5E+04	7E+03	6
	7	7,6E+04	7E+03	6	1,01E+05	8E+03	6	1,01E+05	8E+03	6
	10	9,9E+04	8E+03	6	1,02E+05	8E+03	6	8,8E+04	7E+03	6
	15	8,5E+04	7E+03	6	8,1E+04	7E+03	6	8,2E+04	7E+03	6
25	7,2E+04	7E+03	6	6,4E+04	6E+03	6	5,6E+04	6E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,08	0,01	3	0,09	0,01	3	0,10	0,01	3
	3	5,6	0,3	9	1,8	0,2	9	3,7	0,2	9
	5	12	1	6	3,3	0,2	6	6,9	0,3	9
	7	11	1	6	2,8	0,2	9	6,7	0,3	9
	10	15	1	6	3,1	0,2	9	5,3	0,3	9
	15	14	1	6	2,9	0,2	9	5,3	0,3	9
25	15	1	6	3,7	0,2	9	5,3	0,3	9	

### H.3.3 3. ekstraktion

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup> -omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,3E+02	5E+01	3	2,5E+02	4E+01	3	4,7E+02	6E+01	3
	3	1,10E+04	8E+02	6	9,9E+03	8E+02	6	9,8E+03	8E+02	6
	5	1,19E+05	9E+03	6	8,5E+04	7E+03	6	9,0E+04	7E+03	6
	7	1,04E+05	8E+03	6	7,2E+04	7E+03	6	7,9E+04	7E+03	6
	10	9,8E+04	8E+03	6	9,3E+04	8E+03	6	6,8E+04	6E+03	6
	15	9,0E+04	7E+03	6	7,0E+04	6E+03	6	8,6E+04	7E+03	6
25	1,09E+05	8E+03	6	9,9E+04	8E+03	6	8,3E+04	7E+03	6	
NN	0	7E+00	7E+00	3	1,3E+01	9E+00	3	7E+00	7E+00	3
	3	6E+01	6E+01	6	2E+02	1E+02	6	2E+02	1E+02	6
	5	3,1E+04	4E+03	6	4,8E+04	5E+03	6	2,1E+04	4E+03	6
	7	3,6E+04	5E+03	6	4,7E+04	5E+03	6	3,5E+04	5E+03	6
	10	5,9E+04	6E+03	6	4,5E+04	5E+03	6	2,8E+04	4E+03	6
	15	4,7E+04	5E+03	6	4,6E+04	5E+03	6	2,5E+04	4E+03	6
25	3,8E+04	5E+03	6	7,0E+04	6E+03	6	4,7E+04	5E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,08	0,01	3	0,06	0,01	3	0,12	0,01	3
	3	2,7	0,2	6	2,4	0,2	6	2,4	0,2	6
	5	29	2	6	21	2	6	22	2	6
	7	25	2	6	18	2	6	19	2	6
	10	24	2	6	23	2	6	17	2	6
	15	22	2	6	17	2	6	21	2	6
25	27	2	6	24	2	6	20	2	6	

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> -omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,2E+02	5E+01	3	3,0E+02	4E+01	3	3,8E+02	5E+01	3
	3	1,21E+04	9E+02	6	1,30E+04	9E+02	6	1,1E+04	1E+03	5
	5	1,14E+05	8E+03	6	1,11E+05	8E+03	6	1,24E+05	9E+03	6
	7	9,2E+04	7E+03	6	1,06E+05	8E+03	6	1,18E+05	8E+03	6
	10	9,3E+04	7E+03	6	8,1E+04	7E+03	6	1,11E+05	8E+03	6
	15	6,5E+04	6E+03	6	4,9E+04	5E+03	6	1,04E+05	8E+03	6
25	9,5E+04	8E+03	6	1,06E+05	8E+03	6	1,22E+05	9E+03	6	
NN	0	7E+00	7E+00	3	3E+01	1E+01	3	1,3E+01	9E+00	3
	3	4E+02	1E+02	6	1,3E+03	3E+02	6	0E+00	0E+00	5
	5	1,5E+04	3E+03	6	6,3E+04	6E+03	6	1,8E+04	3E+03	6
	7	3,2E+04	4E+03	6	9,4E+04	8E+03	6	2,5E+04	4E+03	6
	10	3,3E+04	4E+03	6	9,2E+04	7E+03	6	2,1E+04	4E+03	6
	15	3,0E+04	4E+03	6	9,1E+04	7E+03	6	1,5E+04	3E+03	6
25	4,6E+04	5E+03	6	5,5E+04	6E+03	6	4,7E+04	5E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,08	0,01	3	0,07	0,01	3	0,09	0,01	3
	3	2,9	0,2	6	3,2	0,2	6	2,7	0,2	5
	5	28	2	6	27	2	6	30	2	6
	7	22	2	6	26	2	6	29	2	6
	10	23	2	6	20	2	6	27	2	6
	15	16	2	6	12	1	6	25	2	6
25	23	2	6	26	2	6	30	2	6	

Der blev set bort fra ekstrakt #2, da vækstkurven for NN afveg fra de to øvrige replikater

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup> +omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,4E+02	5E+01	3	3,4E+02	5E+01	3	3,3E+02	5E+01	3
	3	1E+04	9E+02	6	1,5E+04	1E+03	6	1,12E+04	8E+02	6
	5	1E+05	8E+03	6	1,6E+05	1E+04	6	1,28E+05	9E+03	6
	7	1E+05	9E+03	6	1,39E+05	9E+03	6	1,15E+05	8E+03	6
	10	1E+05	9E+03	6	1,28E+05	9E+03	6	8E+04	1E+04	4
	15	1E+05	9E+03	6	1,24E+05	9E+03	6	1,06E+05	8E+03	6
	25	9,6E+04	8E+03	6	1,33E+05	9E+03	6	1,9E+05	1E+04	6
NN	0	7E+00	7E+00	3	1,3E+01	9E+00	3	0E+00	0E+00	3
	3	4E+02	2E+02	6	1,47E+04	9E+02	6	1,4E+03	3E+02	6
	5	1,5E+04	3E+03	6	2,0E+05	1E+04	6	7,3E+04	7E+03	6
	7	3,4E+04	5E+03	6	3,9E+05	5E+04	3	6,8E+04	6E+03	6
	10	3,0E+04	4E+03	6	3,1E+05	5E+04	3	7E+04	1E+04	4
	15	2,5E+04	4E+03	6	1,36E+05	9E+03	6	5,5E+04	6E+03	6
	25	2,4E+04	4E+03	6	2,9E+04	4E+03	6	2,3E+04	4E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,08	0,01	3	0,08	0,01	3	0,08	0,01	3
	3	3,0	0,2	6	3,7	0,2	6	2,7	0,2	6
	5	29	2	6	39	2	6	31	2	6
	7	31	2	6	34	2	6	28	2	6
	10	30	2	6	31	2	6	20	3	4
	15	30	2	6	30	2	6	26	2	6
	25	24	2	6	33	2	6	45	3	6

Der blev set bort fra ekstrakt #1, da vækstkurverne for både P17 og NN afveg fra de to øvrige replikater.

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> +omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,3E+02	5E+01	3	3,3E+02	5E+01	3	2,7E+02	4E+01	3
	3	5,5E+02	6E+01	9	1,8E+04	1E+03	6	1,42E+04	9E+02	6
	5	2,3E+04	1E+03	9	1,8E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
	7	2,0E+04	1E+03	9	1,5E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	10	2,2E+04	4E+03	6	1,8E+05	1E+04	5	1,8E+05	1E+04	6
	15	2,5E+04	4E+03	4	2,0E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6
	25	6E+02	6E+02	6	1,8E+05	1E+04	6	1,40E+05	9E+03	6
NN	0	0E+00	0E+00	3	2E+01	1E+01	3	0E+00	0E+00	3
	3	3,9E+02	5E+01	9	4E+02	1E+02	6	4E+02	1E+02	6
	5	1,00E+05	8E+03	6	2,5E+04	4E+03	6	2,4E+04	4E+03	6
	7	2,0E+05	1E+04	6	2,4E+04	4E+03	6	2,7E+04	4E+03	6
	10	1,43E+05	9E+03	6	3,7E+04	6E+03	5	3,4E+04	5E+03	6
	15	1,19E+05	9E+03	4	2,1E+04	4E+03	6	3,5E+04	5E+03	6
	25	1,21E+05	9E+03	6	4,1E+04	5E+03	6	3,0E+04	4E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,08	0,01	3	0,08	0,01	3	0,07	0,01	3
	3	0,13	0,01	9	4,4	0,3	6	3,5	0,2	6
	5	5,7	0,3	9	45	3	6	46	3	6
	7	5,0	0,3	9	37	2	6	43	3	6
	10	5,5	0,9	6	44	3	5	45	3	6
	15	6	1	4	49	3	6	49	3	6
	25	0,1	0,1	6	44	3	6	34	2	6

Der blev set bort fra blindprøve #1, da vækstkurverne for både P17 og NN afveg fra de to øvrige replikater.

		Blind								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,6E+02	5E+01	3	3,0E+02	4E+01	3	2,7E+02	4E+01	3
	3	9,0E+02	7E+01	9	2,4E+02	4E+01	9	9,0E+02	7E+01	9
	5	3,4E+04	5E+03	6	7,5E+03	7E+02	9	1,6E+04	1E+03	9
	7	2,7E+04	1E+03	9	8,0E+03	7E+02	9	1,7E+04	1E+03	9
	10	9,5E+04	8E+03	6	1,02E+04	8E+02	9	2,2E+04	1E+03	9
	15	4,4E+04	5E+03	6	1,03E+04	8E+02	9	2,2E+04	1E+03	9
25	3,0E+04	1E+03	9	5,4E+04	6E+03	6	2,8E+04	1E+03	9	
NN	0	1,3E+01	9E+00	3	7E+00	7E+00	3	0E+00	0E+00	3
	3	3,6E+02	5E+01	9	5,2E+02	6E+01	9	2,6E+04	1E+03	6
	5	8,6E+04	7E+03	6	1,15E+05	8E+03	6	1,45E+05	9E+03	6
	7	9,4E+04	8E+03	6	1,30E+05	9E+03	6	2,1E+05	1E+04	6
	10	1,05E+06	8E+04	3	1,27E+05	9E+03	6	1,7E+05	1E+04	6
	15	8,8E+04	7E+03	6	9,3E+04	8E+03	6	7,3E+04	7E+03	6
25	8,7E+04	7E+03	6	4,3E+05	5E+04	3	1,6E+05	1E+04	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,09	0,01	3	0,07	0,01	3	0,07	0,01	3
	3	0,22	0,02	9	0,06	0,01	9	0,22	0,02	9
	5	8	1	6	1,8	0,2	9	3,8	0,2	9
	7	6,5	0,3	9	1,9	0,2	9	4,0	0,2	9
	10	23	2	6	2,5	0,2	9	5,4	0,3	9
	15	11	1	6	2,5	0,2	9	5,3	0,3	9
25	7,4	0,3	9	13	1	6	6,9	0,3	9	

#### H.3.4 4. ekstraktion

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup> -omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,2E+02	5E+01	3	3,4E+02	5E+01	3	4,1E+02	5E+01	3
	3	1,24E+05	9E+03	6	8,4E+04	7E+03	6	9,2E+04	7E+03	6
	5	1,18E+05	8E+03	6	1,04E+05	8E+03	6	9,6E+04	8E+03	6
	7	1,19E+05	8E+03	6	9,0E+04	7E+03	6	9,5E+04	8E+03	6
	10	8,4E+04	7E+03	6	7,0E+04	8E+03	5	7,3E+04	7E+03	6
	15	1,02E+05	8E+03	6	9,2E+04	7E+03	6	8,0E+04	7E+03	6
25	1,00E+05	8E+03	6	9,5E+04	8E+03	6	9,0E+04	7E+03	6	
NN	0	2E+01	1E+01	3	2E+01	1E+01	3	7E+00	7E+00	3
	3	1,2E+04	3E+03	6	3,2E+04	4E+03	6	1,2E+04	3E+03	6
	5	6,1E+04	6E+03	6	7,3E+04	7E+03	6	4,2E+04	5E+03	6
	7	3,8E+04	5E+03	6	8,1E+04	7E+03	6	4,0E+04	5E+03	6
	10	3,9E+04	5E+03	6	3,4E+04	5E+03	5	2,6E+04	4E+03	6
	15	4,4E+04	5E+03	6	7,3E+04	7E+03	6	3,3E+04	4E+03	6
25	3,8E+04	5E+03	6	7,6E+04	7E+03	6	4,7E+04	5E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,08	0,01	3	0,08	0,01	3	0,10	0,01	3
	3	30	2	6	20	2	6	22	2	6
	5	29	2	6	25	2	6	23	2	6
	7	29	2	6	22	2	6	23	2	6
	10	21	2	6	17	2	5	18	2	6
	15	25	2	6	22	2	6	20	2	6
25	24	2	6	23	2	6	22	2	6	

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> -omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	4,1E+02	5E+01	3	2,7E+02	4E+01	3	3,2E+02	5E+01	3
	3	1E+05	8E+03	6	1,13E+05	8E+03	6	1,18E+05	8E+03	6
	5	1,11E+05	8E+03	6	1,26E+05	9E+03	6	1,19E+05	9E+03	6
	7	1,06E+05	8E+03	6	1,23E+05	9E+03	6	1,13E+05	8E+03	5
	10	6,6E+04	6E+03	6	2,7E+04	4E+03	6	7,4E+04	7E+03	6
	15	1,03E+05	8E+03	6	1,07E+05	8E+03	6	1,19E+05	9E+03	6
25	1,05E+05	8E+03	6	9,1E+04	7E+03	6	1,16E+05	8E+03	6	
NN	0	1,3E+01	9E+00	3	2E+01	1E+01	3	1,3E+01	9E+00	3
	3	1,3E+04	3E+03	6	1,7E+04	3E+03	6	1,1E+04	3E+03	6
	5	4,5E+04	5E+03	6	4,4E+04	5E+03	6	3,8E+04	5E+03	6
	7	4,7E+04	5E+03	6	7,0E+04	6E+03	6	4,5E+04	5E+03	5
	10	2,4E+04	4E+03	6	7,3E+04	7E+03	6	1,9E+04	3E+03	6
	15	5,4E+04	6E+03	6	5,2E+04	6E+03	6	4,0E+04	5E+03	6
25	3,8E+04	5E+03	6	4,9E+04	5E+03	6	3,4E+04	5E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,10	0,01	3	0,07	0,01	3	0,08	0,01	3
	3	28	2	6	27	2	6	29	2	6
	5	27	2	6	31	2	6	29	2	6
	7	26	2	6	30	2	6	28	2	5
	10	16	2	6	7	1	6	18	2	6
	15	25	2	6	26	2	6	29	2	6
25	26	2	6	22	2	6	28	2	6	

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup> +omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	4,2E+02	5E+01	3	3,2E+02	5E+01	3	3,7E+02	5E+01	3
	3	1,10E+05	8E+03	6	1,12E+05	8E+03	6	1,7E+05	1E+04	6
	5	1,08E+05	8E+03	6	1,30E+05	9E+03	6	2,0E+05	1E+04	6
	7	1,05E+05	8E+03	6	1,6E+05	2E+04	4	1,8E+05	1E+04	6
	10	1,19E+05	8E+03	6	9,7E+04	8E+03	6	1,1E+05	8E+03	6
	15	1,01E+05	8E+03	6	1,30E+05	9E+03	6	1,9E+05	1E+04	6
25	9,9E+04	8E+03	6	1,25E+05	9E+03	6	1,7E+05	1E+04	6	
NN	0	0E+00	0E+00	3	3E+01	1E+01	3	1,3E+01	9E+00	3
	3	1,5E+04	3E+03	6	1,8E+04	3E+03	6	1,6E+04	3E+03	6
	5	3,1E+04	4E+03	6	2,8E+04	4E+03	6	1,6E+04	3E+03	6
	7	4,0E+04	5E+03	6	2,2E+04	6E+03	4	1,8E+04	3E+03	6
	10	2,2E+04	4E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	6,4E+04	6E+03	6
	15	2,8E+04	4E+03	6	3,5E+04	5E+03	6	3,3E+04	4E+03	6
25	2,2E+04	4E+03	6	3,3E+04	4E+03	6	2,7E+04	4E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,10	0,01	3	0,08	0,01	3	0,09	0,01	3
	3	27	2	6	27	2	6	43	3	6
	5	26	2	6	32	2	6	50	3	6
	7	26	2	6	39	4	4	43	3	6
	10	29	2	6	24	2	6	26	2	6
	15	25	2	6	32	2	6	46	3	6
25	24	2	6	31	2	6	41	2	6	

Der blev set bort fra ekstrakt #1, da vækstkurverne for både P17 og NN afveg fra de to øvrige replikater.

		Sort PEM S/V=1,0 cm <sup>-1</sup> +omrystning								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,9E+02	5E+01	3	3,7E+02	5E+01	3	4,1E+02	6E+01	2
	3	1,1E+03	3E+02	9	1,8E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6
	5	2,8E+03	4E+02	9	1,7E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6
	7	3E+03	1E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	10	2,1E+04	1E+03	9	1,6E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
	15	3E+03	1E+03	6	2,0E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
25	2,3E+03	4E+02	9	1,9E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6	
NN	0	7E+00	7E+00	3	5E+01	2E+01	3	3E+01	2E+01	2
	3	3,5E+04	1E+03	9	1,8E+04	3E+03	6	8E+03	2E+03	6
	5	1,6E+05	1E+04	6	3,8E+04	5E+03	6	2,8E+04	4E+03	6
	7	1,04E+05	8E+03	6	4,1E+04	5E+03	6	3,8E+04	5E+03	6
	10	5,9E+04	6E+03	6	1,6E+04	3E+03	6	2,5E+04	4E+03	6
	15	1,28E+05	9E+03	6	3,9E+04	5E+03	6	2,4E+04	4E+03	6
25	6,9E+04	6E+03	6	3,9E+04	5E+03	6	2,1E+04	4E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,09	0,01	3	0,09	0,01	3	0,10	0,02	2
	3	0,28	0,06	9	43	3	6	51	3	6
	5	0,7	0,1	9	42	2	6	41	2	6
	7	0,7	0,3	6	45	3	6	45	3	6
	10	5,1	0,3	9	40	2	6	47	3	6
	15	0,7	0,3	6	50	3	6	46	3	6
25	0,57	0,09	9	45	3	6	44	3	6	

Der blev set bort fra blindprøve #2, da vækstkurverne for både P17 og NN afveg fra de to øvrige replikater.

		Blind								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,0E+02	4E+01	3	4,0E+02	5E+01	3	3,3E+02	5E+01	3
	3	1,7E+04	1E+03	9	2,6E+04	6E+03	4	1,21E+04	9E+02	9
	5	3,1E+04	1E+03	9	5,0E+04	6E+03	6	3,5E+04	5E+03	6
	7	3,1E+04	1E+03	9	5,6E+04	6E+03	6	2,9E+04	1E+03	9
	10	2,5E+04	1E+03	9	8,6E+03	7E+02	9	2,0E+04	1E+03	9
	15	2,7E+04	1E+03	9	7,2E+04	7E+03	6	2,8E+04	1E+03	9
25	3,5E+04	5E+03	6	6,5E+04	6E+03	6	2,7E+04	4E+03	6	
NN	0	7E+00	7E+00	3	1,3E+01	9E+00	3	7E+00	7E+00	3
	3	1,6E+04	1E+03	9	4,2E+05	3E+04	4	2,6E+04	1E+03	9
	5	8,0E+04	7E+03	6	2,1E+05	1E+04	6	1,30E+05	9E+03	6
	7	9,1E+04	7E+03	6	1,9E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6
	10	9,2E+04	7E+03	6	1,9E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	15	8,6E+04	7E+03	6	5,5E+05	6E+04	3	1,37E+05	9E+03	6
25	5,0E+04	6E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	9,8E+04	8E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,07	0,01	3	0,10	0,01	3	0,08	0,01	3
	3	4,2	0,2	9	6	2	4	3,0	0,2	9
	5	7,5	0,3	9	12	1	6	8	1	6
	7	7,5	0,3	9	14	1	6	7,0	0,3	9
	10	6,2	0,3	9	2,1	0,2	9	4,8	0,3	9
	15	6,7	0,3	9	18	2	6	6,9	0,3	9
25	8	1	6	16	2	6	7	1	6	



## H.4 S/V forhold (jævnfør kapitel 7)

### H.4.1 S/V forhold på 0,5 og 1,0 cm-1

Blåt PEM<sub>(1)</sub> materiale blev ekstraheret ved S/V forhold på 0,5 og 1,0 cm<sup>-1</sup> ved 10°C uden omrystning over 9 og 20 døgn. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C. Væksten af P17 blev fulgt ved bestemmelse af kimal på R<sub>2</sub>A dag 0, 5, 7, 10, 15, 20 efter podning. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved 25°C i to-tre døgn.

#### 9 døgns ekstraktion

		Blå PEM <sub>(1)</sub> S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,7E+02	4E+01	3	2,5E+02	4E+01	3	1,9E+02	4E+01	3
	5	3,3E+04	1E+03	9	2,1E+04	1E+03	9	3,6E+04	1E+03	9
	7	5,5E+04	2E+03	9	2,7E+04	1E+03	9	4,2E+04	2E+03	9
	10	6,3E+04	6E+03	6	4,4E+04	5E+03	6	5,3E+04	6E+03	6
	15	1,15E+05	6E+03	12	1,05E+05	6E+03	12	1,10E+05	6E+03	12
	20	9,2E+04	9E+03	5	9,3E+04	8E+03	6	1,04E+05	8E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,07	0,01	3	0,06	0,01	3	0,05	0,01	3
	5	8,2	0,3	9	5,0	0,3	9	8,7	0,4	9
	7	13,4	0,4	9	6,5	0,3	9	10,2	0,4	9
	10	15	2	6	11	1	6	13	1	6
	15	28	1	12	26	1	12	27	1	12
	20	22	2	5	23	2	6	25	2	6

		Blå PEM <sub>(1)</sub> S/V=1,0 cm <sup>-1</sup>								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	3,1E+02	5E+01	3	2,4E+02	4E+01	3	3,3E+02	5E+01	3
	5	3,0E+04	1E+03	9	5,0E+04	2E+03	9	4,1E+04	2E+03	9
	7	4,9E+04	2E+03	9	5,1E+04	2E+03	9	5,0E+04	2E+03	8
	10	5,7E+04	6E+03	6	1,15E+05	8E+03	6	5,0E+04	5E+03	6
	15	1,22E+05	6E+03	12	1,28E+05	6E+03	12	1,17E+05	6E+03	12
	20	1,39E+05	9E+03	6	1,45E+05	9E+03	6	1,16E+05	8E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,08	0,01	3	0,06	0,01	3	0,08	0,01	3
	5	7,4	0,3	9	12,1	0,4	9	10,0	0,4	9
	7	12,0	0,4	9	12,5	0,4	9	12,3	0,5	8
	10	14	1	6	28	2	6	12	1	6
	15	30	1	12	31	2	12	29	1	12
	20	34	2	6	35	2	6	28	2	6

Der blev set bort fra blindprøve #3, da vækstkurven for P17 afveg fra de to øvrige replikater.

		Blind								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	1,8E+02	3E+01	3	3,1E+02	5E+01	3	2,6E+02	4E+01	3
	5	7E+02	2E+02	9	1,1E+03	3E+02	9	4,8E+04	1E+03	9
	7	1,1E+03	3E+02	9	8E+02	2E+02	9	9,4E+03	8E+02	9
	10	5,9E+03	6E+02	6	4,8E+03	5E+02	6	2,6E+04	1E+03	6
	15	1,18E+04	6E+02	12	6,4E+03	6E+02	10	4,7E+04	1E+03	12
	20	1,9E+04	1E+03	6	7,6E+03	7E+02	6	4,8E+04	2E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,04	0,01	3	0,08	0,01	3	0,06	0,01	3
	5	0,18	0,05	9	0,28	0,06	9	4,3	0,3	9
	7	0,28	0,06	9	0,19	0,05	9	2,3	0,2	9
	10	1,4	0,1	6	1,2	0,1	6	6,3	0,3	6
	15	2,9	0,2	12	1,6	0,1	10	11,4	0,3	12
	20	4,7	0,3	6	1,9	0,2	6	11,6	0,4	6

20 døgns ekstraktion

		Blå PEM <sub>(1)</sub> S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	7,3E+02	9E+01	2	7,9E+02	9E+01	2	1,0E+03	1E+02	1
	5	2,7E+05	1E+04	6	2,6E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
	7	2,6E+05	1E+04	9	2,3E+05	1E+04	9	2,0E+05	1E+04	9
	10	2,2E+05	1E+04	9	2,3E+05	1E+04	9	1,9E+05	1E+04	9
	15	1,7E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,18	0,02	2	0,19	0,02	2	0,25	0,03	1
	5	66	3	6	63	3	6	47	3	6
	7	63	3	9	57	3	9	48	3	9
	10	53	3	9	55	3	9	46	3	9
	15	41	2	6	49	3	6	38	2	6

Der blev set bort fra ekstrakt #1, da vækstkurven for P17 afveg fra de to øvrige replikater.

		Blå PEM <sub>(1)</sub> S/V=1,0 cm <sup>-1</sup>								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	9,8E+02	1E+02	4	8,0E+02	1E+02	1	8,6E+02	9E+01	2
	5	6,8E+04	6E+03	6	2,1E+05	1E+04	6	2,2E+05	1E+04	6
	7	5,4E+04	6E+03	9	2,0E+05	1E+04	9	2,0E+05	1E+04	9
	10	6,6E+04	6E+03	9	1,6E+05	1E+04	9	1,7E+05	1E+04	9
	15	6,9E+04	6E+03	6	1,30E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,24	0,03	4	0,20	0,03	1	0,21	0,02	2
	5	17	2	6	51	3	6	53	3	6
	7	13	1	9	48	3	9	48	3	9
	10	16	2	9	40	2	9	41	2	9
	15	17	2	6	32	2	6	37	2	6

		Blind								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	8,6E+02	9E+01	2	1,1E+03	1E+02	2	5,8E+02	8E+01	2
	5	2,0E+03	1E+02	9	3,0E+03	1E+02	9	3,0E+03	1E+02	9
	7	2,8E+03	1E+02	9	4,3E+03	2E+02	9	6,8E+03	6E+02	6
	10	6,8E+03	6E+02	9	6,8E+03	6E+02	9	1,6E+04	1E+03	9
	15	8,5E+03	7E+02	6	7,8E+03	7E+02	6	1,6E+04	1E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,21	0,02	2	0,28	0,03	2	0,14	0,02	2
	5	0,5	0,0	9	0,72	0,03	9	0,72	0,03	9
	7	0,7	0,0	9	1,05	0,04	9	1,7	0,2	6
	10	1,7	0,2	9	1,7	0,2	9	4,0	0,2	9
	15	2,1	0,2	6	1,9	0,2	6	3,9	0,2	6

#### H.4.2 S/V forhold i intervallet 0,06-1,38 cm<sup>-1</sup>

Blåt PEM<sub>(2)</sub> materiale blev ekstraheret ved 7 forskellige S/V forhold i intervallet 0,06 til 1,38 cm<sup>-1</sup> ved 20°C under omrystning over 15 døgn. For S/V forholdene 0,14 og 0,69 cm<sup>-1</sup> blev der endvidere foretaget 5 døgn ekstraktioner. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved 15°C. Væksten af P17 blev fulgt ved bestemmelse af kimal på R<sub>2</sub>A dag 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20 efter podning. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved 25°C i to-tre døgn.

##### 5 døgn ekstraktion

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,14 cm <sup>-1</sup>								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	1,9E+02	4E+01	3	2,6E+02	4E+01	3	2,9E+02	4E+01	3
	1	5,9E+02	6E+01	9	6,2E+02	6E+01	9	4,3E+02	5E+01	9
	2	5,3E+04	6E+03	3	4,9E+04	6E+03	3	5,9E+04	6E+03	3
	3	1,29E+05	9E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	1,16E+05	8E+03	6
	4	1,36E+05	9E+03	6	1,9E+05	1E+04	6	1,05E+05	8E+03	6
	5	1,31E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	7	1,36E+05	9E+03	6	2,0E+05	1E+04	6	1,30E+05	9E+03	6
	10	1,25E+05	9E+03	6	1,7E+05	1E+04	6	1,40E+05	9E+03	6
	15	1,30E+05	9E+03	6	1,7E+05	1E+04	6	9,5E+04	8E+03	6
20	1,01E+05	8E+03	6	1,47E+05	9E+03	6	9,0E+04	7E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,05	0,01	3	0,06	0,01	3	0,07	0,01	3
	1	0,15	0,01	9	0,15	0,01	9	0,11	0,01	9
	2	13	1	3	12	1	3	14	2	3
	3	31	2	6	44	3	6	28	2	6
	4	33	2	6	47	3	6	26	2	6
	5	32	2	6	37	2	6	44	3	6
	7	33	2	6	48	3	6	32	2	6
	10	31	2	6	41	2	6	34	2	6
	15	32	2	6	40	2	6	23	2	6
20	25	2	6	36	2	6	22	2	6	

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,69 cm <sup>-1</sup>								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,4E+02	4E+01	3	2,0E+02	4E+01	3	3,6E+02	5E+01	3
	1	5,8E+02	6E+01	9	6,5E+02	6E+01	9	6,5E+02	6E+01	9
	2	6,7E+04	7E+03	3	1,13E+05	9E+03	3	1,11E+05	9E+03	3
	3	1,5E+05	1E+04	6	2,3E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
	4	1,30E+05	9E+03	6	2,1E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	5	1,29E+05	9E+03	5	1,9E+05	1E+04	5	1,7E+05	1E+04	6
	7	1,40E+05	9E+03	6	2,1E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6
	10	1,5E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	15	1,02E+05	8E+03	6	1,7E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6
20	1,04E+05	8E+03	6	1,7E+05	1E+04	6	1,48E+05	9E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,06	0,01	3	0,05	0,01	3	0,09	0,01	3
	1	0,14	0,01	9	0,16	0,02	9	0,16	0,02	9
	2	16	2	3	27	2	3	27	2	3
	3	37	2	6	55	3	6	46	3	6
	4	32	2	6	51	3	6	45	3	6
	5	32	2	5	47	3	5	42	2	6
	7	34	2	6	50	3	6	50	3	6
	10	37	2	6	38	2	6	44	3	6
	15	25	2	6	41	2	6	37	2	6
20	25	2	6	42	3	6	36	2	6	

		Blind								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,27E+02	3,89E+01	3	1,87E+02	3,53E+01	3	1,73E+02	3,40E+01	3
	1	3,84E+02	4,80E+01	9	2,22E+02	3,65E+01	9	3,00E+02	4,25E+01	9
	2	2,40E+03	1,20E+02	9	1,26E+03	8,68E+01	9	1,74E+03	1,02E+02	9
	3	1,74E+04	1,02E+03	9	7,39E+03	6,66E+02	9	9,37E+03	7,50E+02	9
	4	2,76E+04	1,29E+03	9	1,18E+04	8,41E+02	9	1,08E+04	8,04E+02	9
	5	6,91E+04	6,47E+03	6	3,13E+04	1,37E+03	9	3,30E+04	1,41E+03	9
	7	8,15E+04	1,12E+04	4	5,45E+04	5,75E+03	6	6,00E+04	6,03E+03	6
	10	6,27E+04	6,46E+03	3	4,60E+04	5,54E+03	3	6,87E+04	6,77E+03	3
	15	6,36E+04	6,21E+03	6	4,79E+04	5,39E+03	6	5,64E+04	5,84E+03	6
	20	6,61E+04	6,33E+03	6	4,85E+04	5,42E+03	6	6,18E+04	6,12E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,06	0,01	3	0,05	0,01	3	0,04	0,01	3
	1	0,09	0,01	9	0,05	0,01	9	0,07	0,01	9
	2	0,59	0,03	9	0,31	0,02	9	0,42	0,02	9
	3	4,23	0,25	9	1,80	0,16	9	2,29	0,18	9
	4	6,74	0,31	9	2,87	0,21	9	2,62	0,20	9
	5	16,85	1,58	6	7,63	0,33	9	8,04	0,34	9
	7	19,89	2,73	4	13,30	1,40	6	14,63	1,47	6
	10	15,28	1,58	3	11,22	1,35	3	16,75	1,65	3
	15	15,52	1,51	6	11,68	1,31	6	13,75	1,43	6
	20	16,11	1,54	6	11,83	1,32	6	15,08	1,49	6

15 døgns ekstraktion

Der blev set bort fra ekstrakt #3, da vækstkurven for P17 afveg fra de to øvrige replikater.

		Blå PEM <sub>12</sub> S/V=0,07 cm <sup>-1</sup>								
Kimal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,1E+02	4E+01	3	2,3E+02	4E+01	3	2,1E+02	4E+01	3
	1	3,6E+02	5E+01	9	4,3E+02	5E+01	9	4,7E+02	5E+01	9
	2	1,9E+04	1E+03	9	2,2E+04	1E+03	9	2,9E+04	1E+03	9
	3	7,3E+04	7E+03	6	9,7E+04	8E+03	6	1,7E+05	1E+04	6
	4	1,01E+05	8E+03	6	1,21E+05	9E+03	6	1,33E+05	9E+03	6
	5	1,16E+05	8E+03	6	1,19E+05	9E+03	6	1,8E+05	1E+04	6
	7	1,00E+05	8E+03	6	1,13E+05	8E+03	6	1,8E+05	1E+04	4
	10	8,9E+04	7E+03	6	1,10E+05	8E+03	6	1,6E+05	1E+04	6
	15	1,13E+05	8E+03	6	1,01E+05	8E+03	6	1,6E+05	1E+04	6
	AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.
P17	0	0,05	0,01	3	0,06	0,01	3	0,05	0,01	3
	1	0,09	0,01	9	0,10	0,01	9	0,12	0,01	9
	2	4,6	0,3	9	5,4	0,3	9	7,0	0,3	9
	3	18	2	6	24	2	6	41	2	6
	4	25	2	6	29	2	6	32	2	6
	5	28	2	6	29	2	6	44	3	6
	7	24	2	6	27	2	6	45	3	4
	10	22	2	6	27	2	6	40	2	6
	15	27	2	6	25	2	6	38	2	6

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,14 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,2E+02	4E+01	3	2,1E+02	4E+01	3	2,4E+02	4E+01	3
	1	4,3E+02	5E+01	9	3,4E+02	5E+01	8	3,8E+02	5E+01	9
	2	3,8E+04	5E+03	6	2,6E+04	1E+03	9	2,5E+04	1E+03	9
	3	1,32E+05	9E+03	6	1,15E+05	8E+03	6	9,8E+04	8E+03	6
	4	1,21E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6	1,43E+05	9E+03	6
	5	1,44E+05	9E+03	6	1,37E+05	9E+03	6	1,32E+05	9E+03	6
	7	1,18E+05	8E+03	6	1,44E+05	9E+03	6	1,6E+05	1E+04	6
	10	1,5E+05	1E+04	6	9,3E+04	8E+03	6	1,02E+05	8E+03	6
15	1,45E+05	9E+03	6	1,22E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,05	0,01	3	0,05	0,01	3	0,06	0,01	3
	1	0,10	0,01	9	0,08	0,01	8	0,09	0,01	9
	2	9	1	6	6,5	0,3	9	6,1	0,3	9
	3	32	2	6	28	2	6	24	2	6
	4	29	2	6	36	2	6	35	2	6
	5	35	2	6	33	2	6	32	2	6
	7	29	2	6	35	2	6	40	2	6
	10	37	2	6	23	2	6	25	2	6
15	35	2	6	30	2	6	36	2	6	

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,27 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,1E+02	4E+01	3	1,8E+02	3E+01	3	2,1E+02	4E+01	3
	1	3,8E+02	5E+01	9	4,4E+02	5E+01	9	2,9E+02	4E+01	9
	2	3,6E+04	1E+03	9	4,4E+04	5E+03	6	4,1E+04	5E+03	6
	3	1,7E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6
	4	2,2E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	5
	5	2,4E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6
	7	2,1E+05	1E+04	4	1,32E+05	9E+03	6	1,45E+05	9E+03	6
	10	1,7E+05	1E+04	6	1,44E+05	9E+03	6	1,7E+05	1E+04	6
15	1,38E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6	1,45E+05	9E+03	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,05	0,01	3	0,04	0,01	3	0,05	0,01	3
	1	0,09	0,01	9	0,11	0,01	9	0,07	0,01	9
	2	8,9	0,4	9	11	1	6	10	1	6
	3	41	2	6	45	3	6	52	3	6
	4	54	3	6	47	3	6	45	3	5
	5	59	3	6	49	3	6	42	2	6
	7	50	3	4	32	2	6	35	2	6
	10	43	3	6	35	2	6	41	2	6
15	34	2	6	37	2	6	35	2	6	

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,41 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,3E+02	4E+01	3	2,6E+02	4E+01	3	2,9E+02	4E+01	3
	1	3,9E+02	5E+01	9	3,4E+02	5E+01	9	3,8E+02	5E+01	9
	2	5,2E+04	6E+03	6	3,9E+04	5E+03	6	2,9E+04	1E+03	9
	3	1,41E+05	9E+03	6	1,7E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6
	4	1,5E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
	5	1,33E+05	9E+03	6	1,7E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6
	7	1,19E+05	9E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	10	9,6E+04	8E+03	6	2,0E+05	1E+04	5	1,6E+05	1E+04	6
15	9,5E+04	8E+03	6	1,9E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,06	0,01	3	0,06	0,01	3	0,07	0,01	3
	1	0,10	0,01	9	0,08	0,01	9	0,09	0,01	9
	2	13	1	6	9	1	6	7,0	0,3	9
	3	34	2	6	41	2	6	37	2	6
	4	37	2	6	41	2	6	46	3	6
	5	33	2	6	41	2	6	40	2	6
	7	29	2	6	45	3	6	44	3	6
	10	23	2	6	48	3	5	38	2	6
15	23	2	6	46	3	6	37	2	6	

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,55 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,3E+02	4E+01	3	2,5E+02	4E+01	3	3,6E+02	5E+01	3
	1	4,3E+02	5E+01	9	3,6E+02	5E+01	9	4,4E+02	5E+01	9
	2	5,5E+04	6E+03	6	5,9E+04	6E+03	6	4,1E+04	5E+03	6
	3	2,2E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6
	4	2,0E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6	2,2E+05	1E+04	6
	5	2,2E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6
	7	1,6E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	5
	15	2,1E+05	1E+04	5	2,0E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	15	2,0E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,06	0,01	3	0,06	0,01	3	0,09	0,01	3
	1	0,10	0,01	9	0,09	0,01	9	0,11	0,01	9
	2	13	1	6	14	1	6	10	1	6
	3	54	3	6	52	3	6	40	2	6
	4	48	3	6	44	3	6	53	3	6
	5	54	3	6	52	3	6	49	3	6
	7	40	2	6	44	3	6	45	3	5
	10	50	3	5	49	3	6	43	3	6
15	48	3	6	44	3	6	44	3	6	

Der blev set bort fra ekstrakt #3, da vækstkurven for P17 afveg fra de to øvrige replikater.

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,69 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,5E+02	4E+01	3	2,6E+02	4E+01	3	2,5E+02	4E+01	3
	1	3,9E+02	5E+01	9	4,1E+02	5E+01	9	3,1E+02	4E+01	9
	2	5,6E+04	6E+03	6	4,6E+04	5E+03	6	3,5E+04	5E+03	6
	3	3,1E+05	1E+04	6	2,5E+05	1E+04	6	2,2E+05	1E+04	6
	4	2,7E+05	1E+04	6	2,6E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6
	5	3,2E+05	1E+04	6	3,1E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6
	7	2,7E+05	1E+04	6	3,2E+05	5E+04	3	2,0E+05	1E+04	6
	10	2,8E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6
15	2,4E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,06	0,01	3	0,06	0,01	3	0,06	0,01	3
	1	0,10	0,01	9	0,10	0,01	9	0,07	0,01	9
	2	14	1	6	11	1	6	8	1	6
	3	76	3	6	60	3	6	53	3	6
	4	66	3	6	63	3	6	49	3	6
	5	79	3	6	76	3	6	50	3	6
	7	67	3	6	78	11	3	49	3	6
	10	69	3	6	48	3	6	48	3	6
15	58	3	6	48	3	6	37	2	6	

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=1,38 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,5E+02	4E+01	3	2,1E+02	4E+01	3	2,2E+02	4E+01	3
	1	3,8E+02	5E+01	9	4,3E+02	5E+01	9	3,4E+02	5E+01	9
	2	4,2E+04	5E+03	6	6,2E+04	6E+03	6	2,9E+04	1E+03	9
	3	3,0E+05	1E+04	6	3,1E+05	1E+04	6	2,5E+05	1E+04	6
	4	3,1E+05	1E+04	6	2,5E+05	1E+04	6	2,7E+05	1E+04	6
	5	3,0E+05	1E+04	6	3,1E+05	1E+04	6	2,5E+05	1E+04	6
	7	2,9E+05	1E+04	6	2,9E+05	1E+04	6	2,2E+05	4E+04	3
	10	2,3E+05	2E+04	4	2,6E+05	1E+04	6	2,4E+05	1E+04	6
15	2,4E+05	1E+04	6	2,7E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6	
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,06	0,01	3	0,05	0,01	3	0,05	0,01	3
	1	0,09	0,01	9	0,10	0,01	9	0,08	0,01	9
	2	10	1	6	15	1	6	7,1	0,3	9
	3	73	3	6	77	3	6	61	3	6
	4	75	3	6	62	3	6	67	3	6
	5	72	3	6	75	3	6	61	3	6
	7	72	3	6	72	3	6	54	9	3
	10	57	5	4	62	3	6	58	3	6
15	59	3	6	65	3	6	47	3	6	

Der blev set bort fra blindprøve #3, da vækstkurven for P17 afveg fra de to øvrige replikater.

		Blind								
Kimtæl	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	1,6E+02	3E+01	3	2,7E+02	4E+01	3	2,1E+02	4E+01	3
	1	4,9E+02	5E+01	9	4,0E+02	5E+01	9	5,5E+02	6E+01	9
	2	1,7E+04	1E+03	6	7,8E+03	7E+02	6	1,28E+04	9E+02	6
	3	7,6E+04	7E+03	6	4,2E+04	2E+03	9	1,29E+05	9E+03	6
	4	6,0E+04	6E+03	6	8,5E+04	7E+03	6	1,5E+05	1E+04	6
	5	6,5E+04	1E+04	4	5,8E+04	6E+03	6	1,41E+05	9E+03	6
	7	8,7E+04	7E+03	6	6,5E+04	6E+03	6	1,7E+05	1E+04	6
	10	1,04E+05	8E+03	6	6,8E+04	6E+03	6	1,24E+05	9E+03	6
	15	8,7E+04	7E+03	6	6,8E+04	6E+03	6	1,41E+05	9E+03	5
AOC-værd	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,04	0,01	3	0,07	0,01	3	0,05	0,01	3
	1	0,12	0,01	9	0,10	0,01	9	0,13	0,01	9
	2	4,2	0,2	6	1,9	0,2	6	3,1	0,2	6
	3	19	2	6	10,2	0,4	9	31	2	6
	4	15	1	6	21	2	6	37	2	6
	5	16	2	4	14	1	6	34	2	6
	7	21	2	6	16	2	6	41	2	6
	10	25	2	6	17	2	6	30	2	6
	15	21	2	6	17	2	6	34	2	5

## **H.5 Undersøgelse af udvalgte materialer (jævnfør kapitel 8)**

Fem forskellige polymere materialer blev ekstraheret ved et S/V forhold på  $0,5 \text{ cm}^{-1}$  ved  $20^\circ\text{C}$  under omrystning over 15 døgn. Efter materialet var taget op, blev ekstrakterne podet med P17 og inkuberet ved  $15^\circ\text{C}$ . Væksten af P17 blev fulgt ved bestemmelse af kimtal på R<sub>2</sub>A dag 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 efter podning. R<sub>2</sub>A-pladerne blev inkuberet ved  $25^\circ\text{C}$  i to-tre døgn.



### H.5.1 Serie 1

Dag 29 efter podning blev ekstrakterne tilsat 20 µg acetat-C/L, hvorefter inkuberingen ved 15°C fortsatte med yderlige bestemmelse af kimalt dag 29, 32, 34 efter podning.

Der blev set bort fra ekstrakt #3, da vækstkurven afveg fra de to øvrige replikater.

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>									
Kimalt	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	6,3E+02	6E+01	3	5,6E+02	6E+01	3	5,2E+02	6E+01	3	
	1	2,2E+03	1E+02	3	2,4E+03	1E+02	3	3,0E+03	1E+02	3	
	2	7,2E+04	7E+03	3	9,3E+04	8E+03	3	1,7E+05	1E+04	2	
	3	1,13E+05	8E+03	6	1,30E+05	9E+03	6	2,6E+05	1E+04	6	
	4	1,29E+05	9E+03	6	1,46E+05	9E+03	6	2,7E+05	1E+04	6	
	5	1,31E+05	9E+03	6	1,7E+05	1E+04	6	2,5E+05	1E+04	6	
	7	1,5E+05	3E+04	3	1,19E+05	9E+03	6	2,4E+05	1E+04	6	
	10	1,11E+05	9E+03	3	1,4E+05	1E+04	3	2,6E+05	1E+04	3	
	15	9,9E+04	8E+03	3	1,28E+05	9E+03	3	2,1E+05	1E+04	3	
	29	8,3E+04	7E+03	3	9,4E+04	8E+03	3	2,1E+05	1E+04	3	
	32	1,35E+05	9E+03	6	1,33E+05	9E+03	6	2,4E+05	1E+04	6	
	34	1,4E+05	1E+04	3	1,33E+05	9E+03	3	2,6E+05	1E+04	3	
	AOC-værdi	Dag	[µg C/L]	E.o.m.	N	[µg C/L]	E.o.m.	N	[µg C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,15	0,02	3	0,14	0,01	3	0,13	0,01	3
		1	0,53	0,03	3	0,57	0,03	3	0,74	0,03	3
2		18	2	3	23	2	3	42	3	2	
3		27	2	6	32	2	6	65	3	6	
4		31	2	6	36	2	6	67	3	6	
5		32	2	6	42	2	6	62	3	6	
7		36	8	3	29	2	6	58	3	6	
10		27	2	3	34	2	3	64	3	3	
15		24	2	3	31	2	3	52	3	3	
29		20	2	3	23	2	3	52	3	3	
32		33	2	6	33	2	6	60	3	6	
34		34	2	3	33	2	3	62	3	3	

Der blev set bort fra ekstrakterne #1 og #2, da disse var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved ATP-måling).

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>									
Kimalt	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	4,4E+02	5E+01	3	4,9E+02	6E+01	3	4,7E+02	6E+01	3	
	1	4,3E+02	5E+01	3	5,7E+02	6E+01	3	2,0E+03	1E+02	3	
	2	9,6E+02	8E+01	9	6,2E+02	6E+01	9	1,7E+05	1E+04	3	
	3	3,1E+03	4E+02	9	2,3E+03	4E+02	9	2,3E+05	1E+04	6	
	4	8,3E+03	7E+02	3	2,6E+03	1E+02	6	2,5E+05	1E+04	6	
	5	2,1E+04	1E+03	6	5,2E+03	6E+02	6	2,4E+05	1E+04	6	
	7	4,5E+04	5E+03	3	5,2E+03	6E+02	6	2,2E+05	1E+04	6	
	10	7,5E+04	2E+03	3	1,7E+04	1E+03	3	2,7E+05	1E+04	3	
	15	8,9E+04	8E+03	3	2,8E+04	1E+03	3	2,4E+05	1E+04	3	
	29	6,4E+04	2E+03	3	2,8E+04	1E+03	3	2,0E+05	1E+04	3	
	32	1,44E+05	9E+03	6	1,01E+05	8E+03	6	2,0E+05	1E+04	6	
	34	1,5E+05	1E+04	3	1,08E+05	8E+03	3	1,9E+05	1E+04	3	
	AOC-værdi	Dag	[µg C/L]	E.o.m.	N	[µg C/L]	E.o.m.	N	[µg C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,11	0,01	3	0,12	0,01	3	0,11	0,01	3
		1	0,11	0,01	3	0,14	0,01	3	0,50	0,03	3
2		0,23	0,02	9	0,15	0,01	9	41	3	3	
3		0,7	0,1	9	0,57	0,09	9	56	3	6	
4		2,0	0,2	3	0,62	0,03	6	60	3	6	
5		5,1	0,3	6	1,3	0,1	6	60	3	6	
7		11	1	3	1,3	0,1	6	53	3	6	
10		18,2	0,5	3	4,2	0,3	3	65	3	3	
15		22	2	3	6,9	0,3	3	60	3	3	
29		15,6	0,5	3	6,9	0,3	3	48	3	3	
32		35	2	6	25	2	6	48	3	6	
34		38	2	3	26	2	3	46	3	3	

Der blev set bort fra alle tre ekstrakter, da de var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved måling af ATP).

		PVC(Zn/Ca) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>									
Kimtal	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	4,4E+02	5E+01	3	4,6E+02	6E+01	3	5,3E+02	6E+01	3	
	1	4,7E+02	6E+01	3	4,9E+02	6E+01	3	4,7E+02	6E+01	3	
	2	1,35E+03	9E+01	9	4,4E+02	5E+01	9	4,9E+02	5E+01	9	
	3	4,6E+03	5E+02	9	6E+02	2E+02	9	3E+02	1E+02	9	
	4	1,4E+04	1E+03	3	8,7E+02	7E+01	6	8,2E+02	7E+01	6	
	5	2,6E+04	1E+03	6	1,33E+03	9E+01	9	8,7E+02	7E+01	9	
	7	3,1E+04	1E+03	6	2,1E+03	1E+02	6	1,25E+03	9E+01	6	
	10	4,4E+04	2E+03	3	4,2E+03	2E+02	3	2,6E+03	1E+02	3	
	15	6,3E+04	6E+03	3	9,2E+03	8E+02	3	5,6E+03	2E+02	3	
	29	4,7E+04	2E+03	3	1,20E+04	9E+02	3	1,9E+04	1E+03	3	
	32	1,38E+05	9E+03	6	7,3E+04	7E+03	6	6,5E+04	6E+03	6	
	34	1,31E+05	9E+03	3	7,4E+04	7E+03	3	8,0E+04	7E+03	3	
	AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,11	0,01	3	0,11	0,01	3	0,13	0,01	3
		1	0,12	0,01	3	0,12	0,01	3	0,12	0,01	3
2		0,33	0,02	9	0,11	0,01	9	0,12	0,01	9	
3		1,1	0,1	9	0,15	0,05	9	0,07	0,03	9	
4		3,5	0,2	3	0,21	0,02	6	0,20	0,02	6	
5		6,3	0,3	6	0,32	0,02	9	0,21	0,02	9	
7		7,6	0,3	6	0,51	0,03	6	0,30	0,02	6	
10		10,8	0,4	3	1,03	0,04	3	0,64	0,03	3	
15		15	2	3	2,2	0,2	3	1,36	0,05	3	
29		11	0	3	2,9	0,2	3	4,7	0,3	3	
32		34	2	6	18	2	6	16	2	6	
34		32	2	3	18	2	3	20	2	3	

Der blev set bort fra alle tre ekstrakter, da de var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved måling af ATP).

		PVC(Pb) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>									
Kimtal	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	6,0E+02	6E+01	3	5,5E+02	6E+01	3	4,7E+02	6E+01	3	
	1	4,1E+02	5E+01	3	4,2E+02	5E+01	3	4,1E+02	5E+01	3	
	2	5,2E+02	6E+01	9	5,2E+02	6E+01	9	5,2E+02	6E+01	9	
	3	7E+02	2E+02	9	8E+02	2E+02	9	5E+02	2E+02	9	
	4	1,42E+03	9E+01	6	7,0E+02	6E+01	6	5,2E+02	6E+01	6	
	5	2,0E+03	1E+02	9	7,4E+02	7E+01	9	4,3E+02	5E+01	9	
	7	3,9E+03	2E+02	6	1,08E+03	8E+01	6	4,7E+02	5E+01	6	
	10	5,5E+03	2E+02	3	1,4E+03	1E+02	3	2,8E+02	4E+01	3	
	15	2,3E+04	1E+03	3	2,0E+03	1E+02	3	1,5E+02	3E+01	3	
	29	2,8E+04	1E+03	3	0E+00	0E+00	3	0E+00	0E+00	3	
	32	1,04E+05	8E+03	6	7,3E+04	7E+03	3	1E+02	2E+01	9	
	34	8,7E+04	8E+03	3	7,5E+04	7E+03	3	4E+01	2E+01	3	
	AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,15	0,02	3	0,13	0,01	3	0,12	0,01	3
		1	0,10	0,01	3	0,10	0,01	3	0,10	0,01	3
2		0,13	0,01	9	0,13	0,01	9	0,13	0,01	9	
3		0,18	0,05	9	0,21	0,05	9	0,12	0,04	9	
4		0,35	0,02	6	0,17	0,02	6	0,13	0,01	6	
5		0,49	0,03	9	0,18	0,02	9	0,11	0,01	9	
7		0,95	0,04	6	0,26	0,02	6	0,11	0,01	6	
10		1,35	0,05	3	0,35	0,02	3	0,07	0,01	3	
15		5,6	0,3	3	0,49	0,03	3	0,04	0,01	3	
29		6,8	0,3	3	0	0	3	0	0	3	
32		25	2	6	18	2	3	0,02	0,01	9	
34		21	2	3	18	2	3	0	0	3	

		PVC(Org.) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>									
Kimtal	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	5,4E+02	6E+01	3	5,5E+02	6E+01	3	4,3E+02	5E+01	3	
	1	1,6E+03	1E+02	3	2,0E+03	1E+02	3	2,0E+03	1E+02	3	
	2	1,19E+05	9E+03	3	1,27E+05	9E+03	3	1,03E+05	8E+03	3	
	3	1,9E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6	1,32E+05	9E+03	6	
	4	1,8E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6	
	5	1,6E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	
	7	1,47E+05	9E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	1,27E+05	9E+03	6	
	10	1,8E+05	1E+04	3	2,0E+05	1E+04	3	1,4E+05	1E+04	3	
	15	1,5E+05	1E+04	3	1,6E+05	1E+04	3	1,5E+05	1E+04	3	
	29	6,2E+04	2E+03	3	9,8E+04	3E+03	3	6,7E+04	2E+03	3	
	32	1,24E+05	9E+03	6	2,1E+05	1E+04	6	1,44E+05	9E+03	6	
	34	1,34E+05	9E+03	3	1,9E+05	1E+04	3	1,7E+05	1E+04	3	
	AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,13	0,01	3	0,13	0,01	3	0,10	0,01	3
1		0,40	0,03	3	0,48	0,03	3	0,48	0,03	3	
2		29	2	3	31	2	3	25	2	3	
3		47	3	6	48	3	6	32	2	6	
4		44	3	6	42	2	6	37	2	6	
5		39	2	6	41	2	6	39	2	6	
7		36	2	6	45	3	6	31	2	6	
10		44	3	3	48	3	3	35	2	3	
15		37	2	3	40	3	3	37	2	3	
29		15,0	0,5	3	24,0	0,6	3	16,5	0,5	3	
32		30	2	6	52	3	6	35	2	6	
34		33	2	3	46	3	3	40	3	3	

		Blind									
Kimtal	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	4,8E+02	5,7E+01	3	5,0E+02	5,8E+01	3	4,9E+02	5,7E+01	3	
	1	5,1E+02	5,8E+01	3	4,5E+02	5,5E+01	3	5,4E+02	6,0E+01	3	
	2	2,8E+03	1,3E+02	9	2,7E+03	1,3E+02	9	2,3E+03	1,2E+02	9	
	3	1,09E+04	8,1E+02	9	1,00E+04	7,8E+02	9	9,5E+03	7,6E+02	9	
	4	1,9E+04	1,1E+03	6	2,2E+04	1,2E+03	6	1,61E+04	9,9E+02	6	
	5	2,3E+04	1,2E+03	6	2,9E+04	1,3E+03	6	1,8E+04	1,0E+03	6	
	7	2,3E+04	1,2E+03	6	4,2E+04	1,6E+03	6	2,1E+04	1,1E+03	6	
	10	3,4E+04	1,5E+03	3	5,5E+04	1,9E+03	3	2,6E+04	1,3E+03	3	
	15	3,5E+04	1,5E+03	6	4,8E+04	1,7E+03	6	2,9E+04	1,3E+03	6	
	29	3,3E+04	1,5E+03	3	4,5E+04	1,7E+03	3	2,5E+04	1,3E+03	3	
	32	1,12E+05	8,2E+03	6	1,35E+05	9,0E+03	6	1,16E+05	8,4E+03	6	
	34	1,27E+05	9,2E+03	3	1,25E+05	9,1E+03	3	1,13E+05	8,7E+03	3	
	AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,12	0,01	3	0,12	0,01	3	0,12	0,01	3
1		0,13	0,01	3	0,11	0,01	3	0,13	0,01	3	
2		0,68	0,03	9	0,67	0,03	9	0,57	0,03	9	
3		2,7	0,2	9	2,4	0,2	9	2,3	0,2	9	
4		4,5	0,3	6	5,4	0,3	6	3,9	0,2	6	
5		5,7	0,3	6	7,0	0,3	6	4,4	0,3	6	
7		5,7	0,3	6	10,2	0,4	6	5,1	0,3	6	
10		8,3	0,4	3	13,4	0,5	3	6,4	0,3	3	
15		8,5	0,4	6	11,7	0,4	6	7,1	0,3	6	
29		8,2	0,4	3	11,0	0,4	3	6,2	0,3	3	
32		27	2	6	33	2	6	28	2	6	
34		31	2	3	30	2	3	27	2	3	

## H.5.2 Serie 2

Dag 20 efter podning blev ekstrakterne tilsat 25 µg acetat-C/L, hvorefter inkuberingen ved 15°C fortsatte med yderlige bestemmelse af kimtal dag 20, 23, 25 efter podning.

Der blev set bort fra alle tre ekstrakter, da de var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved måling af ATP).

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>									
Kimtal	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	3,2E+02	5E+01	3	2,6E+02	4E+01	3	2,3E+02	4E+01	3	
	1	6,8E+02	7E+01	3	5,6E+02	6E+01	3	8,1E+02	7E+01	3	
	2	1,04E+03	8E+01	9	1,00E+03	8E+01	9	9,5E+02	8E+01	9	
	3	1,4E+03	3E+02	9	1,5E+03	3E+02	9	2,1E+03	4E+02	9	
	4	1,4E+03	3E+02	9	1,7E+03	3E+02	9	2,9E+03	4E+02	9	
	5	2,4E+03	1E+02	6	3,4E+03	1E+02	6	6,1E+03	6E+02	3	
	7	4,0E+03	2E+02	6	5,3E+03	6E+02	3	1,6E+04	1E+03	3	
	10	5,7E+03	6E+02	3	1,7E+04	1E+03	6	3,6E+04	1E+03	6	
	15	1,04E+04	8E+02	3	3,2E+04	1E+03	3	4,6E+04	2E+03	3	
	20	8,8E+03	7E+02	6	4,4E+04	2E+03	6	4,8E+04	2E+03	6	
	23	8,7E+04	7E+03	6	1,20E+05	9E+03	6	1,19E+05	9E+03	6	
	25	9,0E+04	7E+03	6	1,25E+05	9E+03	6	1,09E+05	8E+03	6	
	AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,08	0,01	3	0,06	0,01	3	0,06	0,01	3
		1	0,17	0,02	3	0,14	0,01	3	0,20	0,02	3
2		0,25	0,02	9	0,24	0,02	9	0,23	0,02	9	
3		0,34	0,07	9	0,37	0,07	9	0,51	0,09	9	
4		0,34	0,07	9	0,41	0,08	9	0,70	0,10	9	
5		0,59	0,03	6	0,82	0,03	6	1,5	0,2	3	
7		0,97	0,04	6	1,3	0,1	3	3,9	0,3	3	
10		1,4	0,1	3	4,2	0,3	6	8,8	0,4	6	
15		2,5	0,2	3	7,8	0,4	3	11,1	0,4	3	
20		2,2	0,2	6	10,7	0,4	6	11,7	0,4	6	
23		21	2	6	29	2	6	29	2	6	
25		22	2	6	31	2	6	27	2	6	

Der blev set bort fra ekstrakt #3, da vækstkurven for P17 afveg fra de to øvrige replikater.

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>									
Kimtal	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	2,4E+02	4E+01	3	2,6E+02	4E+01	3	2,2E+02	4E+01	3	
	1	5,8E+02	6E+01	3	5,7E+02	6E+01	3	6,2E+02	6E+01	3	
	2	3,4E+03	1E+02	9	2,9E+03	1E+02	9	5,1E+04	2E+03	6	
	3	5,2E+04	2E+03	9	6,0E+04	2E+03	9	2,5E+05	1E+04	6	
	4	1,6E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	3,0E+05	1E+04	6	
	5	1,9E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	3,2E+05	1E+04	6	
	7	1,6E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6	3,5E+05	1E+04	6	
	10	1,7E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	3,8E+05	2E+04	6	
	15	1,6E+05	1E+04	3	1,5E+05	1E+04	3	3,6E+05	2E+04	3	
	20	1,6E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	3,2E+05	1E+04	6	
	23	1,04E+05	8E+03	6	1,39E+05	9E+03	6	3,3E+05	1E+04	6	
	25	1,7E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	3,1E+05	1E+04	6	
	AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,06	0,01	3	0,06	0,01	3	0,05	0,01	3
		1	0,14	0,02	3	0,14	0,02	3	0,15	0,02	3
2		0,8	0,0	9	0,71	0,03	9	12,3	0,4	6	
3		12,7	0,4	9	14,5	0,5	9	61	3	6	
4		40	2	6	39	2	6	73	3	6	
5		46	3	6	40	2	6	79	3	6	
7		39	2	6	43	3	6	85	4	6	
10		42	3	6	39	2	6	92	4	6	
15		39	3	3	36	2	3	87	4	3	
20		40	2	6	39	2	6	77	3	6	
23		25	2	6	34	2	6	81	3	6	
25		41	2	6	39	2	6	76	3	6	

Der blev set bor fra alle tre ekstrakter, da de var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved måling af ATP).

		PVC(Zn/Ca) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,4E+02	4E+01	3	3,2E+02	5E+01	3	3,3E+02	5E+01	3
	1	6,9E+02	7E+01	3	4,7E+02	6E+01	3	6,3E+02	6E+01	3
	2	9,4E+02	8E+01	9	5,8E+02	6E+01	9	7,4E+02	7E+01	9
	3	1,8E+03	3E+02	9	7E+02	2E+02	9	1,5E+03	3E+02	9
	4	6,6E+03	6E+02	6	8,1E+02	7E+01	9	1,47E+03	9E+01	9
	5	8,9E+03	8E+02	3	9,6E+02	8E+01	6	2,4E+03	1E+02	6
	7	1,15E+04	8E+02	6	9,8E+02	8E+01	6	5,9E+03	6E+02	3
	10	1,6E+04	1E+03	6	1,25E+03	9E+01	6	7,7E+03	7E+02	6
	15	1,6E+04	1E+03	3	2,2E+03	1E+02	3	1,13E+04	9E+02	3
	20	1,48E+04	9E+02	6	2,8E+03	1E+02	6	1,21E+04	9E+02	6
	23	9,0E+04	7E+03	6	6,5E+04	6E+03	6	6,5E+04	6E+03	6
	25	8,5E+04	7E+03	6	8,2E+04	7E+03	6	1,07E+05	8E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,06	0,01	3	0,08	0,01	3	0,08	0,01	3
	1	0,17	0,02	3	0,12	0,01	3	0,15	0,02	3
	2	0,23	0,02	9	0,14	0,01	9	0,18	0,02	9
	3	0,44	0,08	9	0,18	0,05	9	0,37	0,07	9
	4	1,6	0,2	6	0,20	0,02	9	0,36	0,02	9
	5	2,2	0,2	3	0,23	0,02	6	0,58	0,03	6
	7	2,8	0,2	6	0,24	0,02	6	1,4	0,2	3
	10	3,8	0,2	6	0,31	0,02	6	1,9	0,2	6
	15	4,0	0,3	3	0,53	0,03	3	2,7	0,2	3
	20	3,6	0,2	6	0,69	0,03	6	2,9	0,2	6
	23	22	2	6	16	2	6	16	2	6
	25	21	2	6	20	2	6	26	2	6

Der blev set bort fra ekstrakt #3, da dette var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved måling af ATP).

		PVC(Pb) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,0E+02	4E+01	3	2,1E+02	4E+01	3	2,1E+02	4E+01	3
	1	2,8E+02	4E+01	3	6,0E+02	6E+01	3	6,5E+02	7E+01	3
	2	2,2E+03	1E+02	9	4,0E+04	2E+03	6	7,2E+03	7E+02	6
	3	5,8E+04	6E+03	6	1,27E+05	9E+03	6	2,3E+04	1E+03	9
	4	1,6E+05	1E+04	6	1,44E+05	9E+03	6	3,5E+04	1E+03	9
	5	1,6E+05	1E+04	6	1,23E+05	9E+03	6	3,7E+04	1E+03	6
	7	1,5E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	5,1E+04	6E+03	3
	10	1,41E+05	9E+03	6	1,33E+05	9E+03	3	6,2E+04	6E+03	6
	15	1,29E+05	9E+03	3	1,23E+05	9E+03	3	5,3E+04	6E+03	3
	20	8,1E+04	7E+03	6	1,16E+05	8E+03	6	4,7E+04	2E+03	6
	23	1,05E+05	8E+03	6	1,8E+05	1E+04	5	1,37E+05	9E+03	6
	25	1,11E+05	8E+03	6	1,5E+05	1E+04	6	1,19E+05	8E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,05	0,01	3	0,05	0,01	3	0,05	0,01	3
	1	0,07	0,01	3	0,15	0,02	3	0,16	0,02	3
	2	0,53	0,03	9	9,7	0,4	6	1,8	0,2	6
	3	14	1	6	31	2	6	5,5	0,3	9
	4	38	2	6	35	2	6	8,5	0,4	9
	5	39	2	6	30	2	6	9,0	0,4	6
	7	37	2	6	39	2	6	12	1	3
	10	34	2	6	32	2	3	15	1	6
	15	31	2	3	30	2	3	13	1	3
	20	20	2	6	28	2	6	11,5	0,4	6
	23	26	2	6	43	3	5	33	2	6
	25	27	2	6	36	2	6	29	2	6

Der blev set bort fra ekstrakt #1 og #2, da de var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved måling af ATP).

		PVC(Org.) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>									
Kimtal	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	2,1E+02	4E+01	3	2,5E+02	4E+01	3	2,7E+02	4E+01	3	
	1	8,1E+02	7E+01	3	5,7E+02	6E+01	3	8,1E+02	7E+01	3	
	2	9,2E+03	7E+02	6	4,4E+02	5E+01	9	4,6E+04	2E+03	6	
	3	2,6E+04	1E+03	9	5E+02	2E+02	9	1,47E+05	9E+03	6	
	4	5,5E+04	6E+03	6	8,7E+02	7E+01	9	1,6E+05	1E+04	6	
	5	5,0E+04	2E+03	6	9,5E+02	8E+01	6	1,6E+05	1E+04	6	
	7	5,3E+04	6E+03	6	1,5E+03	1E+02	6	1,5E+05	1E+04	6	
	10	5,1E+04	6E+03	6	3,8E+03	2E+02	6	1,5E+05	1E+04	6	
	15	5,2E+04	6E+03	3	1,20E+04	3E+02	3	1,4E+05	1E+04	3	
	20	4,6E+04	2E+03	6	1,6E+04	1E+03	6	1,09E+05	8E+03	6	
	23	1,35E+05	9E+03	6	1,35E+05	9E+03	6	1,8E+05	1E+04	6	
	25	1,5E+05	1E+04	6	1,03E+05	8E+03	6	2,0E+05	1E+04	6	
	AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,05	0,01	3	0,06	0,01	3	0,07	0,01	3
		1	0,20	0,02	3	0,14	0,01	3	0,20	0,02	3
2		2,2	0,2	6	0,11	0,01	9	11,2	0,4	6	
3		6,3	0,3	9	0,13	0,04	9	36	2	6	
4		13	1	6	0,21	0,02	9	39	2	6	
5		12,1	0,4	6	0,23	0,02	6	40	2	6	
7		13	1	6	0,38	0,02	6	37	2	6	
10		12	1	6	0,92	0,04	6	38	2	6	
15		13	1	3	2,93	0,07	3	34	2	3	
20		11,3	0,4	6	3,9	0,2	6	27	2	6	
23		33	2	6	33	2	6	44	3	6	
25		37	2	6	25	2	6	48	3	6	

		Blind									
Kimtal	Dag	#1			#2			#3			
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	
P17	0	3,5E+02	5E+01	3	2,4E+02	4E+01	3	2,5E+02	4E+01	3	
	1	7,7E+02	7E+01	3	7,0E+02	7E+01	3	7,0E+02	7E+01	3	
	2	2,0E+03	1E+02	9	2,0E+03	1E+02	9	1,8E+03	1E+02	9	
	3	1,11E+04	8E+02	9	1,48E+04	9E+02	9	6,0E+03	6E+02	9	
	4	2,2E+04	1E+03	9	3,9E+04	2E+03	9	1,38E+04	9E+02	9	
	5	3,0E+04	1E+03	6	4,0E+04	2E+03	6	2,3E+04	1E+03	6	
	7	3,9E+04	2E+03	6	4,6E+04	2E+03	6	3,2E+04	1E+03	6	
	10	3,2E+04	1E+03	6	5,1E+04	2E+03	6	3,3E+04	1E+03	6	
	15	4,1E+04	2E+03	3	5,3E+04	2E+03	3	3,4E+04	2E+03	3	
	20	3,6E+04	1E+03	6	5,6E+04	2E+03	6	3,2E+04	1E+03	6	
	23	1,6E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6	
	25	1,5E+05	1E+04	6	1,46E+05	9E+03	6	1,21E+05	9E+03	6	
	AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
	P17	0	0,08	0,01	3	0,06	0,01	3	0,06	0,01	3
		1	0,19	0,02	3	0,17	0,02	3	0,17	0,02	3
2		0,49	0,03	9	0,48	0,03	9	0,44	0,03	9	
3		2,7	0,2	9	3,6	0,2	9	1,5	0,1	9	
4		5,3	0,3	9	9,4	0,4	9	3,4	0,2	9	
5		7,3	0,3	6	9,8	0,4	6	5,6	0,3	6	
7		9,5	0,4	6	11,2	0,4	6	7,7	0,3	6	
10		7,8	0,3	6	12,4	0,4	6	8,0	0,3	6	
15		9,9	0,4	3	12,9	0,5	3	8,3	0,4	3	
20		8,8	0,4	6	13,6	0,4	6	7,9	0,3	6	
23		38	2	6	38	2	6	37	2	6	
25		38	2	6	36	2	6	29	2	6	

### H.5.3 Serie 3

Der blev set bort fra ekstrakterne #2 og #3, da de var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved måling med ATP).

		Blå PEM <sub>(2)</sub> S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	1,8E+02	3E+01	3	2,2E+02	4E+01	3	1,9E+02	4E+01	3
	1	1,07E+03	8E+01	3	3,5E+02	5E+01	3	4,7E+02	6E+01	3
	2	1,7E+05	1E+04	3	2,3E+04	1E+03	6	2,6E+04	1E+03	6
	3	2,5E+05	1E+04	6	8,1E+04	7E+03	6	9,5E+04	8E+03	6
	4	2,6E+05	1E+04	6	1,44E+05	9E+03	6	1,7E+05	1E+04	6
	5	2,3E+05	1E+04	6	1,32E+05	9E+03	6	1,6E+05	1E+04	6
	7	2,4E+05	1E+04	6	1,47E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6
	10	2,4E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6	1,5E+05	1E+04	6
	15	1,9E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6	1,07E+05	8E+03	6
	20	2,2E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,04	0,01	3	0,05	0,01	3	0,05	0,01	3
	1	0,26	0,02	3	0,08	0,01	3	0,11	0,01	3
	2	41	3	3	5,7	0,3	6	6,3	0,3	6
	3	60	3	6	20	2	6	23,2	1,9	6
	4	64	3	6	35	2	6	41,2	2,5	6
	5	55	3	6	32	2	6	39,9	2,4	6
	7	59	3	6	36	2	6	37,7	2,4	6
	10	58	3	6	40	2	6	37,3	2,3	6
	15	45	3	6	42	2	6	26,2	2,0	6
	20	53	3	6	41	2	6	43,3	2,5	6

Der blev set bort fra ekstrakterne #2 og #3, da de var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved måling med ATP).

		Sort PEM S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,7E+02	4E+01	3	1,5E+02	3E+01	3	2,1E+02	4E+01	3
	1	9,4E+02	8E+01	3	4,2E+02	5E+01	3	4,8E+02	6E+01	3
	2	1,5E+05	1E+04	3	3,7E+04	2E+03	6	2,5E+04	1E+03	6
	3	2,2E+05	1E+04	6	1,18E+05	8E+03	6	1,31E+05	9E+03	5
	4	2,5E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	5	2,6E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
	7	2,5E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6
	10	2,6E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
	15	2,4E+05	1E+04	6	2,3E+05	1E+04	6	2,2E+05	1E+04	6
	20	2,8E+05	1E+04	6	2,2E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,07	0,01	3	0,04	0,01	3	0,05	0,01	3
	1	0,23	0,02	3	0,10	0,01	3	0,12	0,01	3
	2	35	2	3	9,1	0,4	6	6,2	0,3	6
	3	53	3	6	29	2	6	32	2	5
	4	61	3	6	40	2	6	43	3	6
	5	63	3	6	44	3	6	47	3	6
	7	60	3	6	49	3	6	50	3	6
	10	63	3	6	50	3	6	47	3	6
	15	59	3	6	56	3	6	54	3	6
	20	68	3	6	52	3	6	47	3	6

		PVC(Zn/Ca) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	1,7E+02	3E+01	3	1,9E+02	4E+01	3	2,8E+02	4E+01	3
	1	1,24E+03	9E+01	3	9,1E+02	8E+01	3	8,9E+02	8E+01	3
	2	1,21E+05	9E+03	3	1,19E+05	9E+03	3	9,8E+04	8E+03	3
	3	1,7E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6	1,6E+05	1E+04	6
	4	1,9E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	5	1,7E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6
	7	2,2E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6	1,9E+05	1E+04	6
	10	1,7E+05	1E+04	6	1,33E+05	9E+03	6	1,9E+05	1E+04	6
	15	1,6E+05	1E+04	6	1,39E+05	9E+03	6	1,8E+05	1E+04	6
	20	1,7E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,04	0,01	3	0,05	0,01	3	0,07	0,01	3
	1	0,30	0,02	3	0,22	0,02	3	0,22	0,02	3
	2	29	2	3	29	2	3	24	2	3
	3	41	2	6	47	3	6	39	2	6
	4	47	3	6	47	3	6	44	3	6
	5	43	3	6	43	3	6	49	3	6
	7	54	3	6	47	3	6	46	3	6
	10	42	2	6	32	2	6	46	3	6
	15	40	2	6	34	2	6	45	3	6
	20	42	2	6	40	2	6	42	2	6

Der blev set bort fra ekstrakt #1, da dette var kontamineret med uønskede bakterier (bestemt ved måling med ATP).

		PVC(Pb) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,1E+02	4E+01	3	2,4E+02	4E+01	3	1,4E+02	3E+01	3
	1	4,9E+02	6E+01	3	1,1E+03	9E+01	3	1,05E+03	8E+01	3
	2	3,2E+03	1E+02	9	8,0E+04	7E+03	3	7,5E+04	7E+03	3
	3	1,29E+04	9E+02	9	1,5E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6
	4	2,8E+04	1E+03	9	1,47E+05	9E+03	6	2,1E+05	1E+04	6
	5	3,5E+04	1E+03	9	1,9E+05	1E+04	6	1,7E+05	1E+04	6
	7	4,3E+04	2E+03	6	1,9E+05	1E+04	3	1,7E+05	1E+04	6
	10	4,1E+04	2E+03	6	1,7E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	15	4,6E+04	2E+03	6	1,32E+05	9E+03	6	1,8E+05	1E+04	6
	20	4,4E+04	2E+03	6	1,35E+05	9E+03	6	1,5E+05	1E+04	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,05	0,01	3	0,06	0,01	3	0,03	0,01	3
	1	0,12	0,01	3	0,27	0,02	3	0,26	0,02	3
	2	0,77	0,03	9	20	2	3	18	2	3
	3	3,1	0,2	9	37	2	6	52	3	6
	4	6,7	0,3	9	36	2	6	52	3	6
	5	8,6	0,4	9	46	3	6	40	2	6
	7	10,4	0,4	6	46	3	3	42	2	6
	10	9,9	0,4	6	42	3	6	44	3	6
	15	11,2	0,4	6	32	2	6	43	3	6
	20	10,8	0,4	6	33	2	6	37	2	6



		PVC(Org.) S/V=0,5 cm <sup>-1</sup>								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,0E+02	4E+01	3	1,3E+02	3E+01	3	2,5E+02	4E+01	3
	1	1,01E+03	8E+01	3	1,01E+03	8E+01	3	1,04E+03	8E+01	3
	2	1,5E+05	1E+04	3	1,05E+05	8E+03	3	1,15E+05	9E+03	3
	3	2,0E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	4	2,4E+05	1E+04	6	2,2E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6
	5	2,5E+05	1E+04	6	2,2E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	7	2,3E+05	1E+04	6	2,4E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6
	10	2,0E+05	1E+04	6	2,3E+05	1E+04	6	2,1E+05	1E+04	6
	15	2,0E+05	1E+04	6	2,0E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
	20	1,7E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6	1,8E+05	1E+04	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,05	0,01	3	0,03	0,01	3	0,06	0,01	3
	1	0,25	0,02	3	0,25	0,02	3	0,25	0,02	3
	2	36	2	3	26	2	3	28	2	3
	3	49	3	6	52	3	6	44	3	6
	4	59	3	6	52	3	6	51	3	6
	5	60	3	6	53	3	6	44	3	6
	7	57	3	6	58	3	6	52	3	6
	10	48	3	6	56	3	6	52	3	6
	15	49	3	6	48	3	6	45	3	6
	20	42	3	6	44	3	6	43	3	6

		Blind								
Kimtal	Dag	#1			#2			#3		
		[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N	[CFU/mL]	E.o.m.	N
P17	0	2,1E+02	4E+01	3	2,5E+02	4E+01	3	1,3E+02	3E+01	3
	1	5,5E+02	6E+01	3	6,2E+02	6E+01	3	5,0E+02	6E+01	3
	2	4,3E+03	2E+02	9	3,9E+03	2E+02	9	3,1E+03	1E+02	9
	3	1,8E+04	1E+03	9	3,4E+04	1E+03	9	1,34E+04	9E+02	9
	4	6,5E+04	6E+03	6	9,0E+04	7E+03	6	4,8E+04	5E+03	6
	5	8,8E+04	8E+03	3	8,7E+04	8E+03	3	5,9E+04	6E+03	3
	7	1,15E+05	9E+03	3	9,9E+04	8E+03	3	7,9E+04	7E+03	3
	10	1,15E+05	8E+03	6	8,7E+04	7E+03	6	7,1E+04	7E+03	6
	15	9,9E+04	8E+03	6	8,1E+04	7E+03	6	8,7E+04	7E+03	6
	20	1,18E+05	8E+03	6	8,9E+04	7E+03	6	7,6E+04	7E+03	6
AOC-værdi	Dag	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N	[ug C/L]	E.o.m.	N
P17	0	0,05	0,01	3	0,06	0,01	3	0,03	0,01	3
	1	0,13	0,01	3	0,15	0,02	3	0,12	0,01	3
	2	1,04	0,04	9	0,94	0,04	9	0,75	0,03	9
	3	4,5	0,3	9	8,3	0,3	9	3,3	0,2	9
	4	16	2	6	22	2	6	12	1	6
	5	21	2	3	21	2	3	14	2	3
	7	28	2	3	24	2	3	19	2	3
	10	28	2	6	21	2	6	17	2	6
	15	24	2	6	20	2	6	21	2	6
	20	29	2	6	22	2	6	18	2	6

