

Het conserveren van monsters voor het bacteriologisch onderzoek van water

Inleiding

Bij het bacteriologisch onderzoek van oppervlaktewater is het conserveren van watermonsters een belangrijke factor. Volgens normblad NEN 6559 (1e druk, december 1981) dient een watermonster binnen drie uur na monstername onderzocht te worden, of bij 0-4 °C te worden bewaard gedurende maximaal 24 uur. Een van de gronden voor deze aanbeveling vormde een onderzoek van Kampelmacher en Van Noorle Jansen [1974]. Hierin werd aangetoond dat het aantal 'thermotolerante *E.coli*' in zeewater

plaatse werd uit beide flessen een MPN-bepaling in tienvoud ingezet in formiaat-glutamaatbouillon. Na 24 en 48 uur bebroeding bij 37 °C werden buizen met gasvorming bevestigd in briljantgroen-galactosebouillon bij 44 °C (NEN 6557). MPN-waarden werden berekend volgens De Man [1975].

De flessen werden onder verschillende omstandigheden bewaard, en na 6 en ca. 24 uur werden wederom temperatuurmetingen en bacteriologisch onderzoek uitgevoerd. In de opeenvolgende jaren waren de bewaaromstandigheden als volgt (eerste 6 uur-volgende 18 uur):

I (1980) isolerende container zonder koelelementen o.i.d. - koelkast in laboratorium,

II (1980) koelkast laboratoriumauto - koelkast in laboratorium,

III (1981) smeltend ijs - koelkast laboratorium,

IV (1981) koelkast laboratoriumauto - koelkast laboratorium,

V (1983) smeltend ijs - smeltend ijs,

VI (1983) koelkast laboratoriumauto (nieuw) - koelkast laboratorium.

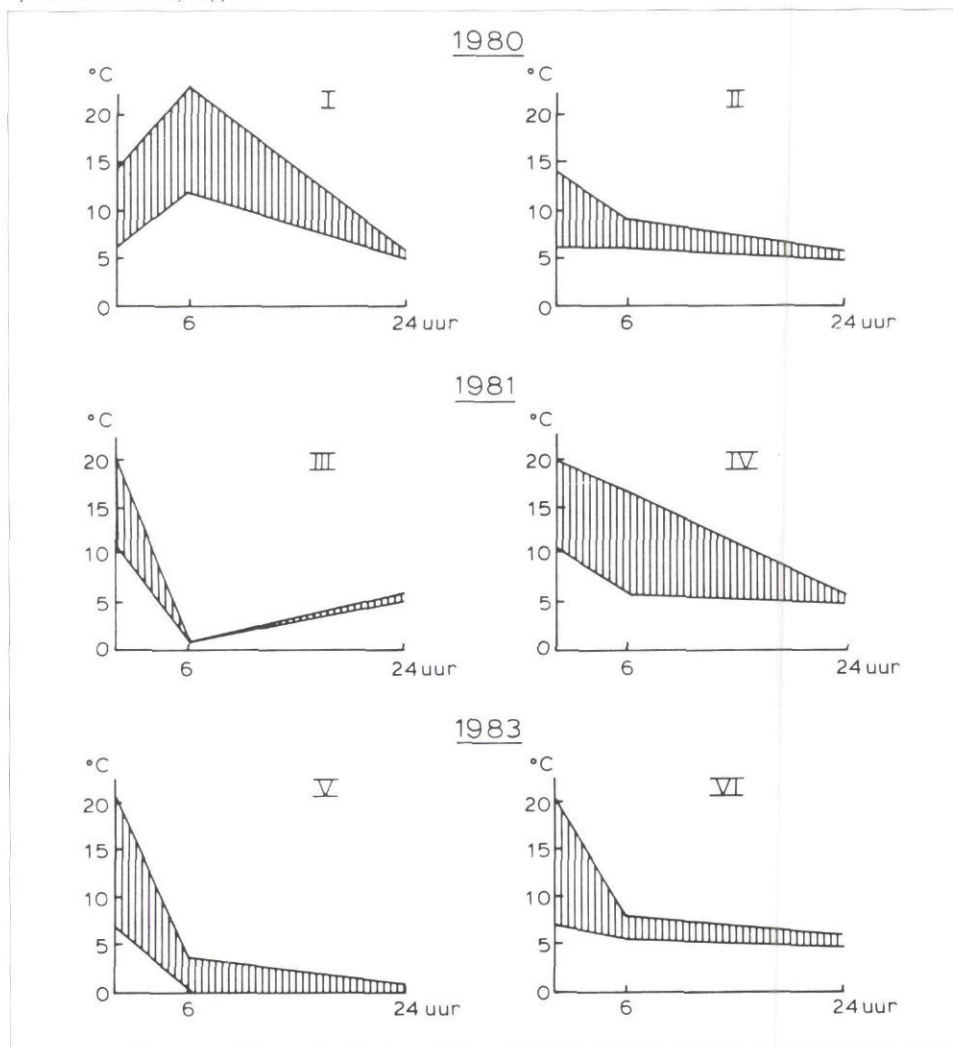
De koelkasten waren steeds afgesteld op ca. 4 °C, met uitzondering van die in de laboratoriumauto in serie VI (2-3 °C). De statistische bewerkingen, waarbij werd uitgegaan van de decimale logaritmen van de gevonden MPN-waarden, bestonden uit tweezijdige gepaarde t-toetsen op de verschillen.

Resultaten en discussie

Op ieder monsterpunt werden steeds twee verschillende flessen gevuld en direct bacteriologisch onderzocht. Vergelijking van de beide MPN-waarden leidde tot de conclusie dat er geen significant verschil bestond tussen de beide resultaten, noch voor rivier- of zeewatermonsters afzonderlijk, noch voor alle monsters samen. Hieruit mag worden afgeleid dat het bacteriologisch onderzoek - binnen de marges van nauwkeurigheid van de MPN-bepaling - voldoende herhaalbaar was.

Een indruk van het temperatuurverloop in de

Afb. 1 - Temperatuurverloop in de monsterflessen. Het gearceerde gedeelte geeft het gebied aan waarin de gemeten waarden op de verschillende tijdstippen zich bevonden.



A. H. HAVELAAR
Rijksinstituut voor de
Volksgezondheid, Bilthoven



M. DURING
Rijksinstituut voor de
Volksgezondheid, Bilthoven



R. PETERS
Rijksinstituut voor de
Volksgezondheid, Bilthoven

(MPN-bepaling in Eijkmanse vloeistof) niet significant verminderde bij bewaren gedurende 24 uur in een koelkast, afgesteld op 4 °C. Niettegenstaande bovenstaande ontstond bij recenter onderzoek in ons laboratorium de indruk dat bij onderzoek van monsters rivierwater wel een reductie van het aantal *E.coli* (en *Salmonella*) optrad bij bewaren in de koelkast gedurende een nacht. Omdat inmiddels de relatief ongevoelige en aan storingen onderhevige Eijkman-methode was vervangen door de gevoeligere en selectievere methode volgens NEN 6557 (1e druk, 1981), werd besloten nogmaals een vergelijkend onderzoek uit te voeren naar de invloed van het bewaren van monsters water onder verschillende omstandigheden.

Materiaal en methoden

In de maanden mei en juni van de jaren 1980, 1981 en 1983 werd steeds een viertal monstertochten gemaakt met een laboratoriumauto. Ieder jaar werd tweemaal een serie van drie monsters rivierwater genomen (IJssel bij Kampen, Rijn bij Arnhem en Lek bij Vreeswijk) en tweemaal een serie van drie monsters zeewater (Katwijk, Scheveningen, Kijkduin). Op ieder monsterpunt werden twee steriele glazen literflessen gevuld, waarna de temperatuur werd gemeten. Ter

TABEL I – Verandering in het aantal thermotolerante bacteriën van de coligroep in monsters rivier- en zeewater, bewaard onder verschillende omstandigheden.

Serie	Gemiddeld ¹⁰ log verschil t.o.v. direct onderzoek	
	na 6 uur	na 24 uur
I	– 0,28 *	– 0,54 **
II	+ 0,14	– 0,33 *
III	+ 0,10	+ 0,04
IV	– 0,03	+ 0,03
V	– 0,10	– 0,16
VI	– 0,21 *	– 0,25 *

* Significant verschillend ($1 < p < 5\%$).

** Sterk significant verschillend ($p < 1\%$).

monsterflessen is gegeven in afb. 1. Hieruit blijkt dat bij bewaren van de monsters in een isolerende container, doch zonder verdere koeling (serie I), de temperatuur steeg van 6–14 °C naar 12–23 °C. In alle overige gevallen daalde de temperatuur in de monsterflessen, in de koelkast van de laboratoriumwagen tot een minimum van 6 °C (series II, IV en VI), in smeltend ijs tot 0–4 °C (serie III en V). In de koelkast in het laboratorium bereikte de temperatuur van het water meestal een waarde van 5–6 °C. De resultaten van het bacteriologisch onderzoek zijn weergegeven in tabel I. Hierbij is steeds aangegeven de gemiddelde stijging (positief getal) of daling (negatief getal) van de logaritmen der MPN-waarden in de monsters na 6 en 24 uur ten opzichte van de waarden, gevonden direct na monsternamen. De in de tabel gegeven getallen hebben steeds betrekking op rivier- en zeewatermonsters tezamen. De resultaten voor deze monster-soorten afzonderlijk vertoonden slechts geringe verschillen. Uit de tabel kunnen de volgende conclusies worden afgeleid.

- Bewaren van de monsters in ongekoelde toestand (serie I - 6 uur) leidde tot een significante daling van de MPN-waarden met een factor 2. Deze daling zette zich voort bij verdere bewaring in een koelkast (serie I - 24 uur) tot een factor 3,5.
- Bewaren van de monsters in de koelkast van een laboratoriumauto, gevolgd door bewaren in een laboratoriumkoelkast, leidde soms wel (series II - 24 uur, VI - 6 en 24 uur) en soms niet (series II - 6 uur, en VI - 6 en 24 uur) tot een significante daling van de MPN-waarden. De dalingen bleven beperkt tot hoogstens een factor 2.
- Bewaren van de monsters in smeltend ijs leidde niet tot significante veranderingen in de gevonden MPN-waarden (series III en V).

Op grond van deze resultaten kan dan ook de aanbeveling worden gedaan dat monsters water, bestemd voor bacteriologisch onderzoek, zo snel mogelijk gekoeld dienen te worden tot een temperatuur iets boven het vriespunt. Dit kan op eenvoudige wijze bereikt worden door de flessen te plaatsen in smeltend ijs, zoals ook aanbevolen door Dutka en El-Shaarawi [1980].

Literatuur

- Dutka, B. J. and El-Shaarawi, A. (1980). *Microbiological water and effluent sample preservation*. Can J. Microbiol. 26, 921–929.
- Kampelmacher, E. H., Leussink, A. B. en Noorle Jansen, L. M. van (1973). *Directe en uitgestelde MPN bepalingen van thermotolerante E. coli in zeewater*. H₂O 6.
- Man, J. C. de (1975). *The probability of most probable numbers*. Eur. J. Appl. Microbiol. 1, 67–78.



Bepaling stikstof- en fosfaatvrachten

● Slot van pagina 595

wordt een nieuw mengmonster samengesteld. Voor klassegrootten van 0,1, 0,2, 0,3 en 0,4 m³ · s⁻¹ zijn de N- en P-jaarvrachten berekend bij verschillende randvoorwaarden ten aanzien van de maximale mengperiode. In afb. 6 zijn de resultaten weergegeven in procenten van de nauwkeurigste vracht. Het aantal monsters bij een maximale mengperiode van 7 dagen zou bij een debietinterval van 0,1 m³ · s⁻¹ 105 en bij 0,4 m³ · s⁻¹ 49 per jaar hebben bedragen voor het onderzoeksjaar 1979/1980. Voor stikstof zou dit respectievelijk 99,5 en 97,7% van de vracht hebben opgeleverd en voor fosfaat respectievelijk 98,8 en 90,1%. Zeker bij stikstof kan dus met een betrekkelijk gering aantal monsters toch een zeer nauwkeurig beeld van de vracht worden verkregen.

Samenvatting en conclusies

In een landelijk gebied met een geringe bewoningsdichtheid en een intensief ontwikkelde landbouw is onderzoek gedaan naar de invloed van de wijze van bemonstering op de berekende N- en P-vrucht van het oppervlaktewater. Hierbij stonden debietgegevens ter beschikking van een continue registratie en wateranalyses van steekmonsters die minimaal eenmaal in de 6 dagen werden genomen, en van een continue bemonstering. Bij de continue bemonstering zijn in afhankelijkheid van de afvoersituatie 6-, 12-, 18- of 24-uurs mengmonsters geanalyseerd.

Uit een analyse van de gegevens van de periode mei/juni 1979 en januari en februari 1980 blijkt een zeer grote invloed van het debiet en periode van het jaar op met name de concentraties van Kjeldahl-N, totaal-P en Cl⁻. Oppervlakte-afvoer blijkt in het groeiseizoen tot veel lagere gehalten te leiden dan in de winterperiode.

Bij vergelijking van de vrachten berekend uit de continubemonstering en de steekbemonstering blijkt de steekbemonstering tot aanmerkelijk lagere waarden te leiden. De monsters waarop dit betrekking heeft, zijn alle kort (± 10 uur) vóór of na een afvoergolf genomen of tijdens een relatief belangrijke toename van het debiet. Geconcludeerd is dat in situaties met

sedimenttransport de steekbemonstering zal leiden tot een onderschatting van de P-vrucht en de continubemonstering tot een overschatting.

Bij gebruik van continue bemonsterings-apparatuur kunnen de monsters over een aantal dagen worden gemengd ter beperking van de analyses. Uitbreiding van het tijdsinterval waarover gemengd wordt, betekent dat gemiddeld over een heel jaar per dag bij totaal-P 3% minder en bij totaal-N 0,3% minder van de vracht wordt berekend. Voor perioden met een groot aandeel in de vracht heeft uitbreiding van het tijdsinterval met 1 dag ingrijpende gevolgen. Mengen van watermonsters bij continue bemonstering over een vast debietinterval is complexer maar kan leiden tot een belangrijke besparing in monsters. Bij stikstof zou 98% van de vracht kunnen worden vastgesteld met circa 50 monsters in 1 jaar, terwijl voor 96% van de P-vrucht circa 70 monsters benodigd zouden zijn geweest bij een goede keuze van het debietinterval. Verder onderzoek moet worden gedaan naar de belangrijke verschillen in totaal-P gehalte tussen de resultaten van steek- en continubemonstering.

Literatuur

- Harmsen, J. en Drumpt, H. van (1982). *Conservering van watermonsters*. Rapporten nieuwe serie ICW 6, 11 p.
- Hoekstra, J. Th. and Steenvoorden, J. H. A. M. (1981). *Phosphorus from diffuse sources for the surface water in the watershed Nattegatsloot*. In: J. H. A. M. Steenvoorden and W. Rast (eds.) *Impact of non-point sources on water quality in watersheds and lakes: field measurements and the use of models*. Programme on Man and Biosphere, UNESCO, Paris, France No. 5: 198–215.
- Hoeijmakers, T. J. (1982). *Bepaling van fosfaat- en stikstofvrachten in oppervlaktewater*. Nota ICW 1380, 34 p.
- Kouwe, F. A. (1983). *Fosfaattransport in een laaglandbeek: rol van de beekbodem, de invloed van bemonsteringsfrequentie en berekeningsmethode*. H₂O (16), nr. 4, p. 70–73.

