

Metoder for bakteriologiske undersøkelser av vann — Sammenligning og statistiske forhold

Av Gunnar Langeland

Gunnar Langeland har veterinærmedisinsk eksamen fra Norges Veterinærhøgskole 1976. Han er ansatt i Norges landbruksvitenskapelige forskningsråd med arbeidsplass på Institutt for næringsmiddelhygiene, Norges Veterinærhøgskole.

1. INNLEDNING

Bakteriologiske undersøkelser av vann omfatter tre forskjellige kategorier av bakterier

- Indikatorbakterier
- Kimtall
- Patogene bakterier

Indikatorbakterieundersøkelser og kimtallsundersøkelser (inkl. fluorescerende kim) er alltid *kvantitative*. Undersøkelser for patogene bakterier (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, enteropatogene *Escherichia coli*, *Vibrio spp.* m.fl.) er mer arbeidskrevende og utføres derfor oftest bare *kvalitativt*.

Ved kvantitative bakteriologiske undersøkelser er det alltid mengden *levende* bakterier som blir registrert. Dette kan gjøres ved å *telle* hvor mange *kolonier* som fremkommer etter at et kjent volum vann er inokulert i eller på et fast medium (*innstøpningsmetoden* og *membranfiltreringsmetoden*). Eller det kan gjøres ved en *statistisk beregning* som er basert på positive og negative resultater (f.eks. vekst — ikke vekst) i en serie med flytende medier som er inokulert med en kjent mengde av vannprøven (rørmetoden =

Most Probable Number (MPN)-metoden).

I vannprøver er bakteriene fordelt enten enkeltvis, i kjeder eller aggregater, eller de er adherert til organiske eller uorganiske partikler i vannet. Ved de metoder som benyttes ved vannundersøkelser i dag, vil både kjeder, aggregater og flere bakterier som er adherert til en partikkel i vannet, bli registrert bare som *en* bakterie («kolonidannende enhet»).

En homogenisering vil føre til en økning av antall registrerbare enheter, men for sterk homogenisering kan gi reduksjon på grunn av bakteriedrap. Hovedhensikten ved å homogenisere en prøve f.eks. ved risting er ikke å frembringe et maksimalt antall kolonidannende enheter, men å fordele enhetene (bakteriene) mest mulig homogent. (Bonde 1963.) Som vi senere skal se, er en homogen (tilfeldig) fordeling av stor betydning.

Hvilken fordeling har så bakteriene i en vannprøve? Både teoretiske beregninger og praktiske forsøk viser at *Poissonfordelingen* er en brukbar modell for å beskrive variasjonen i bakterietellinger (fordelingsfunksjonen) i en serie gjentak fra en og samme prøve. (Bonde 1963, Ormerod 1974.)

Poissonfordelingen kan derfor brukes som basis for statistiske beregninger over bakterieinnhold i vann.

Matematisk kan Poissonfordeling uttrykkes slik

$$(1) f(x) = \frac{e^{-m} \cdot m^x}{x!}$$

der $f(x)$ er sannsynligheten for utfallet x , m er forventningen av x og e er grunntallet i det naturlige logaritmesystem.

Den kanskje viktigste egenskapen ved Poissonfordeling er at *varians* og *middelverdi* er like store. Enhver kolonitelling er derfor samtidig et estimat for variansen. (Varians er alltid kvadratet av *standardavvik*.)

En annen egenskap er at hvis bakterietallet i f.eks. 1 ml vannprøve følger Poissonfordelingen, så vil også bakterietallet i 10 ml vannprøve følge funksjonen, og med 10 ganger så stor middelverdi og varians, men bare ($\sqrt{10} \approx$) 3,2 ganger så stort standardavvik. (Hodges & Lehmann 1970.)

2. METODER FOR BAKTERIOLOGISKE UNDERSØKELSER AV VANN

De bakteriologiske undersøkelsesmetoder som skal omtales generelt her, er

- platespredningsmetoden (innstøpning og overflatespredning)
- membranfiltermetoden
- rørmotoden
- tampongmetoden

Det finnes også flere andre metoder for bakteriologiske undersøkelser av vann, men disse har i dag liten aktualitet og vil derfor ikke bli omtalt.

Nøyaktig metodikk for indikatorbakterieundersøkelser, kimtallsundersøkelser og undersøkelser for fluorescerende kim er angitt i *Norsk Standard 4751: Metoder for bakteriologiske undersøkelser av drikkevann*.

Isolasjon og identifisering av *patogene bakterier* i vann er både komplisert og tidkrevende og erstattes derfor ofte av indikatorbakterieundersøkelser.

Laboratoriestyr, prøvetakingsmetodikk og frekvens, prøveoppbevaring, medier og ikke minst laboratoriepersonalets trening og erfaring er viktige faktorer som en må ta hensyn til i planlegging og gjennomføring av vannanalyser og ved vurdering av resultatene.

Ved prøvetaking bør *Norsk Standard 4750: Prøvetaking for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann* brukes.

Prøvene må tas slik at de er representative for vannkilden. Enkle undersøkelser tatt med korte intervaller har større verdi enn kompliserte undersøkelser tatt med lange intervaller.

Prøvetakingsutstyr må være sterilt og ikke inneholde kjemiske stoffer som kan innvirke på bakteriene i vannprøven. Dessuten er en aseptisk prøvetakingsteknikk nødvendig.

Det skal alltid fylles to flasker på samme tid og sted og disse skal senere undersøkes uavhengig av hverandre.

Alle opplysninger av betydning må noteres, f.eks. vil inspeksjonen av vannkilden være viktig ved vurdering av resultatene fra de bakteriologiske analyser.

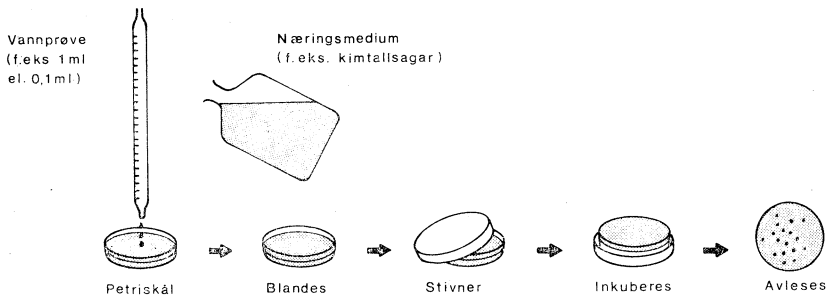
Tid fra prøvetaking til utsæd på bakteriemedier skal ikke overstige 30 timer, og prøvene skal i mellomtiden være nedkjølt til +4°C hvis tiden er over 4 timer.

Flere undersøkelser har vist at for å oppnå reproducerbare og sikre resultater, er det også nødvendig at laboratoriet bruker riktig og veldefinert utstyr og metodikk og at inkubasjonstemperaturer, inkubasjonstider og avlesninger følger Norsk Standard (der dette finnes) eller andre velprøvde metodikker.

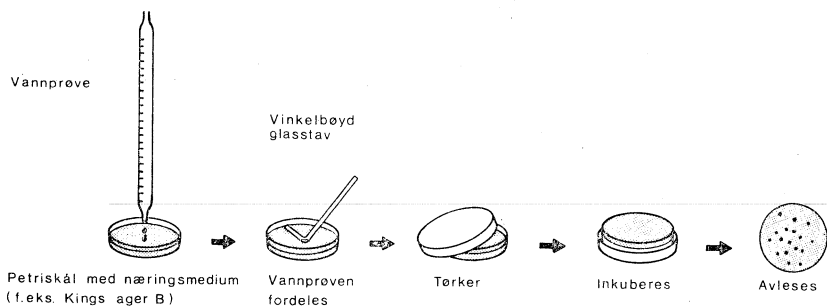
2.1. Platespredningsmetoden.

Begrepet *platespredning* er ikke definert presist i norsk vannforskningsterminologi og vil her bli brukt om alle de

metoder der avlesning foretas ved *direkte kolonitelling*, unntatt telling av kolonier på membranfiltre (membranfiltermetoden). Med *platespredningsmetoden* menes derfor både metoder som baserer seg på *innstøpning* av et kjent volum av en vannprøve i et fast medium i en petriskål (figur 1), og *overflatespredning* av et kjent volum av en vannprøve på et fast medium i en petriskål (figur 2). Innstøpningsmetoden brukes bl.a. for kimtallsundersøkelser, overflatespredningsmetoden brukes bl.a. for undersøkelser for fluorescerende kim.



Figur 1. Platespredningsmetoden. Innstøpning av en vannprøve i et fast medium.



Figur 2. Platespredningsmetoden. Overflatespredning av en vannprøve med vinkelbøyd glasstav på et fast medium.

Metoder der et kjent prøvevolum støpes inn i et fast medium i reagensrør f.eks. undersøkelser for sulfittreduerende clostridier i jernsulfittagar, er prinsipielt ikke forskjellig fra innstøping i eller overflatespredning på fast medium i en petriskål, og må ikke forveksles med røremetoden (MPN-metoden). De samme statistiske beregninger vil derfor kunne anvendes også for analyser som foretas etter en slik metodikk.

Mediene kan tilsettes selektive substanser eller stoffer for indikasjon av spesielle biokjemiske egenskaper hos bakteriene.

Levedyktige bakterier som gis de rette vekstbetingelser, vil formere seg og danne synlige (tellbare) kolonier etter endt inkubasjon.

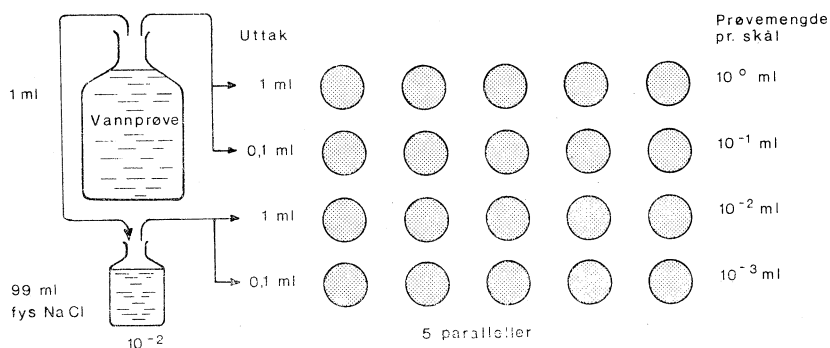
Hvis det på en enkelt skål etter endt inkubasjon telles $C = 200$ kolonier (bakterier), så er standardavviket $\sqrt{C} = \sqrt{200} \approx 14$ kolonier (bakterier). Sann-

synligheten for at det sanne antall bakterier ligger innenfor $C \pm \sqrt{C}$ er 0,68 og sannsynligheten for at det sanne antall bakterier ligger innenfor $C \pm 2 \sqrt{C}$ er 0,95.

En kan også først fastsette en ønsket sannsynlighet og deretter finne det korresponderende intervall (konfidensintervallet) som den ukjente parameter (det sanne bakterieantall) vil bli liggende innenfor. Jo større sannsynlighet — jo større konfidensintervall.

Den relative nøyaktighet for et resultat basert på telling av en skål, er større jo flere kolonier som vokser på skålen.

Telles det 1 koloni på en skål, er standardavviket ($\sqrt{1} = 1$), altså 100%, telles det 10 kolonier er standardavviket 3,2 d.v.s. 32%. En reduksjon i standardavviket kan også oppnås ved å benytte flere skåler, enten med samme eller med forskjellig fortykning (figur 3).



Figur 3. Utsædsskjema for en vannprøve etter platespredningsmetoden. 5 paralleller av 4 fortyninger.

En mye brukt fremgangsmåte har vært å velge data fra bare den «mest brukbare» fortykning ved beregning av det

endelige resultat. Ved en slik praksis vil man ikke få med den informasjon de øvrige tellinger representerer. Det er

dessuten ikke mulig helt objektivt å kunne velge ut skålene fra den «mest brukbare» fortytning. Ved denne praksis er det også en vanlig regel å akseptere bare skåler med mellom 30 og 300 kolonier. Det er ofte vanskelig å telle nøyaktig på skåler med mer enn 200—300 kolonier. Argumentet for ikke å benytte data fra skåler med mindre enn 30 kolonier har vært faktisk at disse data er beheftet med for stor usikkerhet! Dette er riktig hvis bakterietettheten i en prøve beregnes på grunnlag av en eller få skåler med få kolonier, men *alle* skåler der koloniantallet kan telles eksakt, representerer nyttbar informasjon og bør benyttes.

Ved beregning av middeltall (gjennomsnittsverdier) for bakterietettheter er det vanlig å bruke *veid aritmetisk middeltall*,

$$(2) \quad Y = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_n}{W_1 + W_2 + \dots + W_n}$$

der C_1, C_2, \dots, C_n er antall kolonier på n skåler og W_1, W_2, \dots, W_n er de volum av vannprøven som er sådd ut. Er skålen med den i -te utsæd fri for kolonier settes $C_i = 0$ i formelen ovenfor. Når en kan anta at bakterier er fordelt etter Poissonfordelingen, vil veid aritmetisk middeltall for bakterietettheten med feilgrenser \pm standardavviket, SD, være

$$(3) \quad Y \pm SD(Y) = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_n \pm \sqrt{C_1 + C_2 + \dots + C_n}}{W_1 + W_2 + \dots + W_n} \\ = \frac{\sum C_i \pm \sqrt{\sum C_i}}{\sum W_i}$$

Ut fra dette er det ca 68% sannsynlighet for at det sanne bakterieantall ligger mellom den beregnede $Y - SD(Y)$ og $Y + SD(Y)$ og ca. 95% sannsynlighet for at det samme bakterieantall ligger mellom $Y - 2SD(Y)$ og $Y + 2SD(Y)$.

Den generelle formel (3) inkluderer også det spesielle tilfellet der alle volum er like. Hvis $W_1 = W_2 = \dots = W_n = 1$ ml, er $\sum W_i = n =$ antall observasjoner. Ved å sette dette inn i (3) får vi

$$(4) \quad Y \pm SD(Y) = \frac{\sum C_i \pm \sqrt{\sum C_i}}{n} = \frac{\sum C_i}{n} \pm \frac{\sqrt{\sum C_i}}{n} = \bar{C} \pm \sqrt{\frac{\bar{C}}{n}}$$

der \bar{C} = aritmetisk middeltall.

Ved *parallelle* forsøk (gjentak) er det vanlig å beregne bakterietettheten som *logaritmisk middeltall*

$$(5) \quad Y_L = \text{antilog} \cdot \frac{1}{n} \cdot (\log \frac{C_1}{W_1} + \log \frac{C_2}{W_2} + \dots + \log \frac{C_n}{W_n}) = \text{antilog} \cdot \frac{1}{n} \cdot \sum \log \frac{C_i}{W_i}$$

Det må gjøres oppmerksom på at ligning (5) ikke følger av Poissons fordelingsfunksjon, og at bruk av logaritmisk middeltall er en tillempling som gjør at store verdier (topper) blir tillagt mindre vekt.

I ligningene for beregning av logaritmisk middeltall er det ikke mulig å bruke de observasjoner som er null.

2.2. Rørmetoden (MPN-metoden).

Ved rørmetoden foretas ingen direkte registrering av antall bakteriekolonier. Metodens prinsipp er at det fra vannprøven tas ut flere porsjoner som inokuleres på hver sitt rør med flytende medium. Etter endt inkubasjon registreres antall rør med positivt utfall. (Figur 4.) Hva som er positivt utfall vil variere fra metodikk til metodikk — rørmetodens prinsipp er almenyldig. Positivt utfall kan være f.eks. bare bakterievekst, eller bakterievekst med syre- og/eller gassproduksjon.

Ved statistisk behandling av de observerte utfall kan en beregne det mest sannsynlige antall av bakterier i vannprøven, MPN = Most Probable Number.

Dette krever at to forutsetninger er oppfylt (Cochran 1950):

- Bakteriene må være tilfeldig fordelt i vannprøven.
- Ethvert rør vil avleses med positivt utfall hvis *en* eller *flere* bakterier som ved sin formering og metabolisme fører til positiv reaksjon, inokuleres.

Tabeller der resultatene kan avleses direkte, ble utarbeidet av McCrady allerede i 1915. Det er nå publisert en rekke MPN-tabeller for forskjellige inokulasjonsvolum og antall rør. (Cochran

1950, De Man 1975, De Man 1977, McCrady 1915, Woodward 1957, World health organization 1963.) Norsk Standard 4751: *Metoder for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann* inneholder den tabell som er mest brukt ved vannundersøkelser. (Tabell 1.)

De statistiske beregninger tabellene er basert på, er kompliserte og vil ikke bli gjengitt her (McCrady 1915, Cochran 1950, Halvorsen & Ziegler 1933).

Det finnes langt flere kombinasjonsmuligheter av utfall enn de som er angitt i tabellene. F.eks. vil kombinasjonen 0-0-10 positive rør ved inokulasjon 10x10 ml, 10x1 ml og 10x0,1 ml av en vannprøve som inneholder 9 bakterier pr. 100 ml, bare forekomme med sannsynligheten $1,7 \times 10^{-25}$! 0-0-10 gir MNP lik 9 bakterier pr. 100 ml prøve, 95%-konfidensintervallgrense er 5 og 17 bakterier pr. 100 ml. (Woodward 1957.) Hvis en ofte får kombinasjoner som ikke er angitt i tabellene, bør en ta opp til vurdering om rørmetodens forutsetninger er oppfylt.

Rørmetodens ulemper omfatter tid, plass og medier. Dens fordeler er bl.a. at MPN kan beregnes for mange forskjellige utsædskombinasjoner, det totale inokulasjonsvolum kan være stort, metoden er følsom (viser ofte høyere resultater enn andre metoder) og den kan anvendes for enhver organisme forutsatt at et egnet medium eksisterer (Oblinger & Koburger 1975). Skal en kunne beregne det mest sannsynlige antall bakterier i vannprøven, må rørmetoden gi både positive og negative utfall.

La oss ta et eksempel: En vannprøve skal undersøkes for innhold av koliforme bakterier. Vannprøven ristes godt (fordeler bakteriene i vannprøven) og det inokuleres 10 ml av prøven i hvert av 5 rør

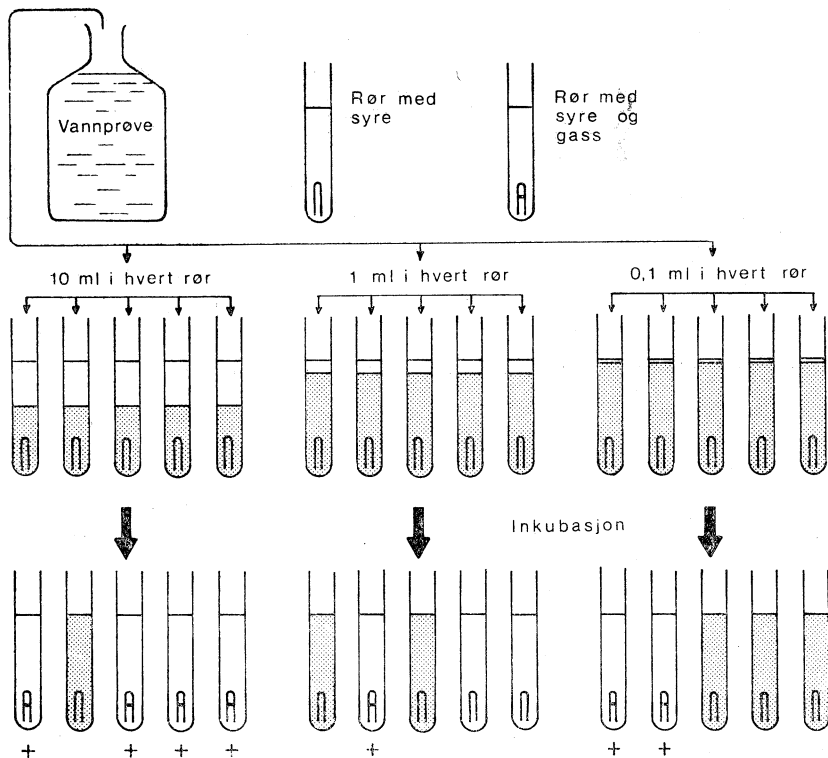
med McConcey-buljong. Etter 2 døgns inkubasjon ved 37°C avleses syre- (gult medium) og gassproduksjon (gassboble i Durhamrøret). Anta at 2 av de 5 rør viser positiv reaksjon. Det mest sannsynlige antall bakterier (MPN) i 100 ml av den opprinnelige prøve avleses i MPN-tabell til å være 2,2 bakterier pr. 100 ml vannprøve. Nedre og øvre 95%-konfidensintervallgrense er 0,1 og 12,6 bakterier pr. 100 ml. Resultatet har altså liten grad av nøyaktighet.

Nøyaktigheten i resultatene kan økes d.v.s. snevrere konfidensintervall, ved å bruke flere rør, evt. serier av rør med forskjellig inokulasjonsvolum.

Norsk Standard 4751 angir at det ved kvantitativ undersøkelse for koliforme bakterier i drikkevannsprøver ved røretoden, skal brukes

- 5 rør som hvert inokuleres med 10 ml vannprøve,
- 5 rør som hvert inokuleres med 1 ml vannprøve, og
- 5 rør som hvert inokuleres med 0,1 ml vannprøve.

Hvis f.eks. 4, 1 og 2 rør viser syre, og gassproduksjon, ser vi av tabell 1 at MPN er 26 bakterier pr. 100 ml vannprøve med 9 og 78 bakterier som nedre og øvre 95%-konfidensintervallgrense.



Figur 4. Røretoden. I rør med både syre og gass er det inokulert en eller flere koliforme bakterier.

Tabell 1. MPN-tabell med 95% konfidensintervall.

Utsæd 5x10 ml., 5x1 ml. og 5x0,1 ml.

Antall rør med positiv reaksjon av			MPN pr. 100 ml	95% konfidensintervall	
5x10 ml	5x1 ml	5x0,1 ml		Nedre grense	Øvre grense
0	0	1	2	< 0.5	7
0	1	0	2	< 0.5	7
0	2	0	4	< 0.5	11
1	0	0	2	< 0.5	7
1	0	1	4	< 0.5	11
1	1	0	4	< 0.5	11
1	1	1	6	< 0.5	15
1	2	0	6	< 0.5	15
2	0	0	5	< 0.5	13
2	0	1	7	1	17
2	1	0	7	1	17
2	1	1	9	2	21
2	2	0	9	2	21
2	3	0	12	3	29
3	0	0	8	1	19
3	0	1	11	2	25
3	1	0	11	2	25
3	1	1	14	4	34
3	2	0	14	4	34
3	2	1	17	5	46
3	3	0	17	5	46
4	0	0	13	3	31
4	0	1	17	5	46
4	1	0	17	5	46
4	1	1	21	7	63
4	1	2	26	9	78
4	2	0	22	7	67
4	2	1	26	9	78
4	3	0	27	9	80
4	3	1	33	11	93
4	4	0	34	12	96
5	0	0	23	7	70
5	0	1	31	11	89
5	0	2	43	15	114
5	1	0	33	11	93
5	1	1	46	16	120
5	1	2	63	21	154
5	2	0	49	17	126
5	2	1	70	23	168
5	2	2	94	28	219
5	3	0	79	25	187
5	3	1	109	31	253
5	3	2	141	37	343
5	3	3	175	44	503
5	4	0	130	35	302
5	4	1	172	43	486
5	4	2	221	57	698
5	4	3	278	90	849
5	4	4	345	117	999
5	5	0	240	68	754
5	5	1	348	118	1 005
5	5	2	542	180	1 405
5	5	3	918	303	3 222
5	5	4	1 609	635	5 805

(International standard for drinking water, World Health Organization 1963.)

MPN-tabellene kan benyttes for andre inokulasjonsvolum enn angitt, f.eks. vil 5×10^1 ml, 5×10^0 ml og 5×10^{-1} ml-tabellen (tabell 1) utmerket kunne brukes for 5×10^{-2} ml, 5×10^{-3} ml og 5×10^{-4} ml. Men her må komma flyttes 3 plasser, d.v.s. tallene i MPN-tabellen må multipliseres med 1000.

Ved analyser av vann med høyt bakterieinnhold som erfaringsmessig viser stor numerisk variasjon, er det vanlig å bruke så mange fortytninger at en vil dekke stort nok område, f.eks. 5×10^{-2} ml, 5×10^{-3} ml, 5×10^{-4} ml, 5×10^{-5} ml og 5×10^{-6} ml.

Det kan oppstå tvil om hvilke 3 fortytninger som skal brukes ved avlesning i MPN-tabellene:

Hvis vi sår ut med fortytninger som angitt ovenfor, og får 5-5-2-0-1 positive rør, hvilke tall skal da velges ved avlesning i MPN-tabellen for 5×10 ml, 5×1 ml og $5 \times 0,1$ ml?

Standard Methods 1975 angir at

- En skal velge den høyeste fortytning der alle rør er positive og de to derpå følgende fortytningene (a, b) evt. velge lavest mulig fortytninger (c).
- Hvis det er positive rør i en fortytning høyere enn de 3 som velges til avlesning, skal dette legges til resultatet av rørene i den høyeste fortytning (d).

Eksempel (3/5 står for 3 positive av i alt 5 rør):

	10 ml	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	Riktig kombinasjon
a	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0
b	5/5	4/5	2/5	0/5	5-4-2
c	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0
d	5/5	3/5	1/5	1/5	5-3-2
e	5/5	3/5	2/5	0/5	5-3-2

2.3. Membranfiltermetoden.

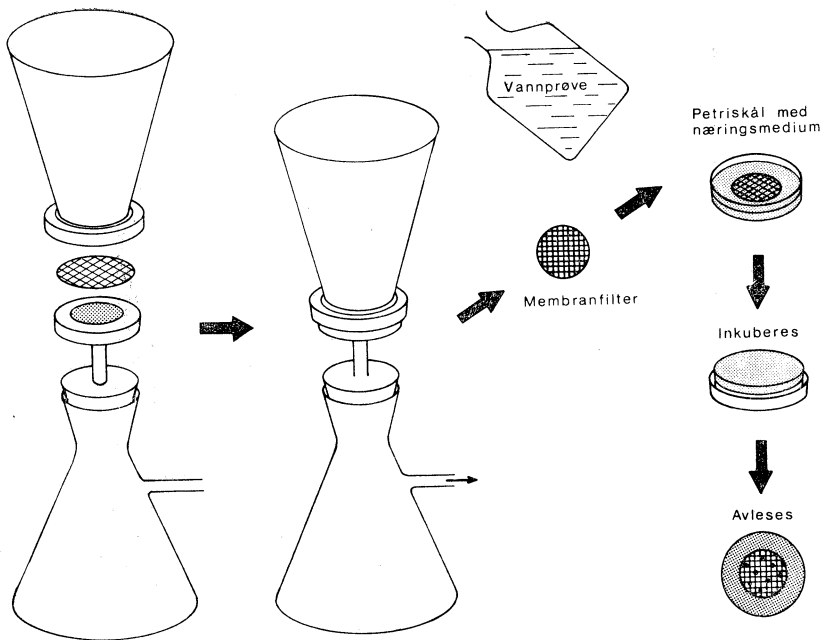
Ved denne metoden filtreres vannprøven (oftest 100 ml) gjennom et membranfilter. Porene i filteret er så små, ca. 0,45 μ m, at bakterier fra vannprøven holdes tilbake på filterets overflate. Filteret plasseres deretter på et fast næringsmedium som diffunderer opp i filteret og gir bakteriene vekstmuligheter. Etter endt inkubasjon klassifiseres og telles koloniene (figur 5). Membranfiltermetoden brukes særlig for undersøkelser for koliforme bakterier, termostabile koliforme bakterier og fekale streptokokker.

Det er vanlig å tilsette mediet selektive substanser og stoffer som muliggjør direkte avlesning av biokjemiske egenskaper.

Istedenfor plassering av filteret på et fast næringsmedium, kan det plasseres på en steril næringspute som inneholder dehydrert medium og som etter tilsetning av sterilt vann gir vekstbetingelser for bakterier på membranfilteret. (Systemet er velegnet til feltforsøk.)

Ved membranfiltermetoden konsentreres altså bakteriene fra vannprøven på filterets overflate. Uoppløste partikler, alger o.l., vil også holdes tilbake, tette igjen filterporer og forstyrre filtrering og avlesninger. Membranfiltermetoden er derfor ikke velegnet for prøver med stor turbiditet.

Membranfiltermetoden er heller ikke egnet for vann som inneholder toksiske



Figur 5. Membranfiltermetoden.

stoffer som forstyrrer veksten av bakterier (Standard Methods 1975, Tobin & Dutka 1977).

De samme lovmessigheter som gjelder for platespredningsmetodene, gjelder også for membranfiltermetoden. En forskjell er at ved membranfiltermetoden er det et mye større volum av prøven som undersøkes. Dette gjør at avlesningene får en større nøyaktighet. Jfr. ligning (3).

Flere arbeider viser at det er stor forskjell mellom membranfiltere fra forskjellige produsenter og også mellom forskjellige partier fra en og samme produsent (Tobin & Dutka 1977, Sladek m.fl. 1975, Schaeffer m.fl. 1974). Det er angitt at også miljøet bakteriene isoleres

fra f.eks. drikkevann eller elvevann, kan ha betydning for hvilke filtertyper som bør velges ved undersøkelser for koliforme bakterier (Brodsky & Schiemann 1975).

Hvis vannet har et høyt innhold av ikke-koliforme bakterier, vil disse kunne interferere med veksten av de koliforme bakterier. Det er vanlig å benytte både rør- og membranfiltermetoder ved vannundersøkelser fra kilder som en har få analysedata fra tidligere. Viser de to metodene god overensstemmelse, vil en etter en tid kunne benytte bare den ene, f.eks. membranfiltermetoden.

Ved vannundersøkelser for koliforme bakterier etter både rør- og membranfiltermetoden gir røretmetoden oftest en høyere

bakterietetthet både for rent og urent vann (Green m.fl. 1977, Mowat 1976, Omland & Lindvåg 1970). Det er antatt at dette særlig er fordi subletale bakterier vil klare seg bedre i de ikke-selektive medier som brukes ved rørmotoden. Ved undersøkelser for *termostabile* koliforme bakterier vil temperaturen ved membranfiltermetoden (44°C) være mer skadelig for svekkede bakterier enn temperaturen ved den presumptive test ved rørmotoden (37°C).

Det er utarbeidet flere forslag til inkubasjonstemperaturer og medier til undersøkelse for termostabile koliforme bakterier der forfatterne angir å ha fått like høye resultater ved membranfiltermetode som ved rørmotode (Green m.fl. 1977).

2.4. Skal en velge rørmotode eller membranfiltermetode?

Det angis i Norsk Standard 4751 at rørmotoden bør benyttes når en vannkilde ikke er godt kjent fra før, mens filtermetoden kan brukes når kilden er godt kjent. Det er flere grunner til dette. Skal en velge rørmotode eller membranfiltermetode. (Hellesnes 1977)?

1. Ved rørmotoden (5x10 ml, 5x1 ml, 5x0,1 ml) kan det registreres fra 0 til 1600 bakterier pr. 100 ml, mens det ved membranfiltermetoden (100 ml filtrert) ikke kan registreres mer enn fra 0 til ca. 200 bakterier pr. 100 ml.
2. Avlesningene ved rørmotoden er enkle, mens avlesningene ved filtermetoden krever lang erfaring, særlig ved undersøkelse av vann der floraen er ukjent.
3. Rørmotoden krever (for termostabile koliforme bakterier) lengre tid enn filtermetoden (4 mot 1 døgn).

4. Rørmotoden kan kreve mye arbeid med videre utsæd.
5. Usikkerheten i resultatene er forskjellige.

2.5. Tampongmetoden.

Tampongmetoden er en rent kvalitativ metode. En steril tampong (ca. 4,5x2 cm) som er laget av opprullet gaze, festes med en steril snor i selve vannkilden. Vann vil strømme gjennom tampongen og små partikler og mikroorganismer vil feste seg (oppkonsentreres). Det er vanlig å la slike tamponger ligge i vannkilden i 1/2—2 døgn før de tas opp og inkuberes enten hele, eller ved at vannet presses over i et egnet medium.

Tampongmetoden er særlig brukt for undersøkelser for patogene mikroorganismer i rennende vann, f.eks. i kloakksluk på slakterier og i utløpsvann fra kloakkrenseanlegg.

2.6. Metoder for undersøkelser m.h.p. patogene bakterier.

Med unntak av avløpsvann og sigevann fra kloakkslam og avfallsfyllinger, er det ikke vanlig å undersøke vann for innhold av patogene bakterier. I stedet for undersøkes vannprøver for innhold av indikatorbakterier.

De viktigste patogene bakterier som kan tenkes overført med vann i Norge, er *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, enteropatogene *E.coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Francisella tularensis* og *Mycobacterium tuberculosis*.

Det er vanlig å foreta undersøkelsene i fire trinn:

1. *Oppformering* i et egnet medium som favoriserer de patogene bakterier det letes etter og som undertrykker den

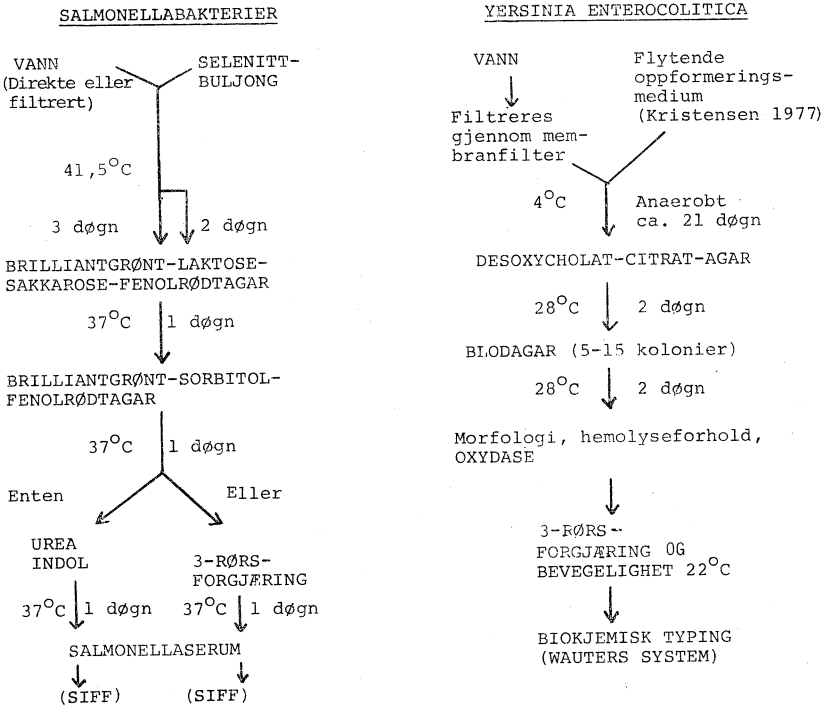
øvrige flora. Dette kan gjøres ved å tilsette mediet selektive komponenter, benytte spesielle temperaturer eller spesielle atmosfæriske forhold.

2. *Isolasjon.* Det benyttes vanligvis ett eller spesielle atmosfæriske forhold, de aktuelle bakterier kan skilles fra den øvrige flora.
3. Anleggelse av *renkultur.*
4. Testing av *morfologi, biokjemiske* og evt. *serologiske egenskaper.* Enkelte

ganger vil det også kunne nyttes forsøksdyr i diagnostikken.

Undersøkelser for patogene bakterier i vann vil oftest være kvalitative, men ved å anvende røretoden er det ingen umulighet å foreta kvantitative undersøkelser for f.eks. salmonellabakterier.

Nedenfor er det skjematisk ført opp hvorledes vi ved Institutt for næringsmiddelhygiene isolerer og identifiserer salmonellabakterier og *Yersinia enterocolitica*. For andre patogene bakterier vises til spesiallitteratur. (Standard metods 1975, Bergeys manual 1974.)



Figur 6. Metodikk for isolasjon av salmonellabakterier og *Yersinia enterocolitica* fra vann. Salmonellabakterieundersøkelsen utføres kvalitativt ved røretoden.

LITTERATUR

- American Public Health Association, American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, eds.*: Standard methods for the examination of water and wastewater. 14th ed. Washington 1976, 1193 pp.
- Bonde, G. J.*: Bacterial indicators of water pollution. 2nd. ed. Thesis. Teknisk Forlag, København 1963, 422 pp.
- Bonde, G. J.*: Bedømmelse af drikkevand af tvivlsom karakter. *Vand*, 1977, 2, 33—34, 37—39, 58.
- Brodsky, M. H. & D. A. Schiemann*: Influence of coliform source on evaluation of membrane filters. *Applied Microbiology*, 1975, 30, 727—730.
- Bø, G.*: Patogene bakterier i vatn. I: Den Norske Veterinærforening. Etterutdanningskurs, Norges veterinærhøgskole 22.—26. august 1977. Kompendium i hydrobiologi for veterinærer, Oslo 1977, 188—200.
- Ciaccio, L. L.*: Water and water pollution handbook. Vol. 2 Marcel Decker, New York, 1971, 800 pp.
- Cochran, W. G.*: Estimation of bacterial densities by means of the «Most probable numbers». *Biometrics*, 1950, 6, 105—116.
- Cuchanan, R. E. & N. E. Gibbons, eds.*: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1974, 1246 pp.
- Dable, H. K.*: Hovedprinsipper for statistisk behandling av biologiske forsøksdata, særlig med henblikk på anvendelse ved mikrobiologisk-hygieniske undersøkelser. *Nordisk veterinærmedisin*, 1972, 24, 519—528.
- De Man, J. C.*: The probability of most probable numbers. *European journal of applied microbiology*, 1975, 1, 67—78.
- De Man, J. C.*: MPN tables for more than one test. *European journal of applied microbiology*, 1977, 4, 307—316.
- Green, B. L., E. Clausen & W. Litsky*: Two-temperature membrane filter method enumerating fecal coliform bacteria from chlorinated effluents. *Applied and environmental microbiology*, 1977, 33, 1259—1264.
- Halvorsen, H. O. & N. R. Ziegler*: Application of statistics to problems in bacteriology. *Journal of bacteriology*, 1933, 25, 101—121.
- Hedberg, M. & D. A. Connor*: Evaluation of coli-count samples for possible use in standard counting of total and fecal coliforms in recreational waters. *Applied microbiology*, 1975, 30, 881—883.
- Hellesnes, I.*: Indikatorbakterier i vann. I: Den Norske veterinærforening. Etterutdanningskurs, Norges veterinærhøgskole 22.—26. aug. 1977. Kompendium i hydrobiologi for veterinærer, Oslo 1977, 188—200.
- Hodges, J. L. & E. L. Lehmann*: Basic concepts of probability and statistics. 2nd. ed., Holden-Day, San Fransisco 1970, 441 pp.
- Kristensen, K. K.*: Forekomst og overlevelsessevne af *Yersinia enterocolitica* og *Yersinia pseudotuberculosis* i spildevand, slam og overfladevand med tilhørende fauna. *Vandkvalitetsinstituttet, Hørsholm* 1977, 38 pp.
- Lassen, J.*: Rapid identification of Gram-negative rods using a three-tube method combined with a dichotomic key. *Acta pathologica et microbiologica scandinavia*, Sect. B, 1975, 83, 525—533.
- McCrary, M. H.*: The numerical interpretation of fermentation-tube results. *The journal of infectious diseases*, 1915, 17, 183—212.

- Mowat, A.*: Most probable number versus membrane filter on chlorinated effluents. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 1976, 48, 724—728.
- Niemelä, S.*: Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examination. *Nordisk metodikkomité for næringsmidler*, Uppsala, 1978.
- Norges Standardiseringsforbund*: Prøvetaking for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann, 1. utg., Oslo 1976, 10 pp. Norsk Standard 4750.
- Norges Standardiseringsforbund*: Metoder for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann, 1. utg. Oslo 1976, 16 pp. Norsk Standard 4751.
- Næss, B. & H. K. Dable*: Sannsynlighetsregning og statistikk i næringsmiddelkontrollen. *Norsk veterinærtidsskrift*, 1969, 21, 465—475.
- Oblinger, J. L. & J. A. Koburger*: Understanding and teaching the most probably number technique. *Journal of milk and food technology*, 1975, 38, 540—545.
- Omland, T. & O. Lindvåg*: The membrane filtration method for the examination of coliforme organisms in drinking water. A comparison with the tube dilution method. *Vann*, 1970, 3, 102—110.
- Ormerod, K.*: Review and comparison of methods used in different countries for the analysis of total coliform bacteria, fecal coliform bacteria, fecal streptococci, *Clostridium perfringens*. *Norsk institutt for vannforskning*, Oslo 1974, 84 pp.
- Schaeffer, D. J., M. C. Long & K. G. Janardan*: Statistical analysis of the recovery of coliform organisms on Gelman and Millipore membrane filters. *Applied microbiology*, 1974, 28, 605—607.
- Sladek, K. J., R. V. Suslavich, B. I. Sohn & F. W. Dawson*: Optimum membrane structure for growth of coliform and fecal coliform organisms. *Applied microbiology*, 1975, 30, 685—691.
- Standridge, J. H. & D. J. Lesar*: Comparison of four-hour and twenty-four-hour refrigerated storage of nonpotable water for fecal coliform analysis. *Applied and environmental microbiology*, 1977, 34, 398—402.
- Tobin, R. S. & B. J. Dutka*: Comparison of the surface structure, metal binding, and fecal coliform recoveries of nine membrane filters. *Applied and environmental microbiology*, 1977, 34, 69—79.
- Woodward, R. L.*: How probable is the Most probable number? *Journal of American Water Works Association*, 1957, 49, 1060—1068.
- World health organization*: International standards for drinking-water. 2nd. ed. Geneva 1963, 206 pp.