

Indikatorer med hygienisk betydning i vann

Av Ivar Hellesnes

Ivar Hellesnes er veterinær fra Norges Veterinærhøgskole 1971. Tilknyttet Institutt for næringsmiddelhygiene, fra 1975 som amanuensis med vann- og miljøhygiene som ansvarsområde. Lisensiatgrad i næringsmiddel- og miljøhygiene 1976. Fra august 1978 kontrollveterinær i Trondheim.

Innledning

Registrering av hygieniske forhold i vann utføres ved å måle mengder av *indikatorbakterier* eller andre stoffer eller organismer som kan gi en peikepinn om forurensingstilstanden i vannet. Ordet indikator er avledet av «index» som betyr peikefinger, og en indikator er definert som «stoff som kan brukes til å påvise nærvær av andre stoffer» (Aschehougs konversasjonsleksikon, 1970). Det er muligheten for nærvær av skadelige stoffer i vann som måles ved hjelp av indikatorer, og i vannhygienisk sammenheng er dette de sjukdomsframkallende bakterier, virus og parasitter (heretter kalt *patogene agens*) som kan utskilles med avføring fra varmblodige organismer. (De patogene agens som kan komme i betraktning, er omtalt andre steder i dette kompendiet).

Det er tradisjonelt de såkalte *indikatorbakteriene* som brukes for hygienisk kontroll av vann. I vårt land har *koliforme bakterier* (KB) og *termostabile koliforme bakterier* (TKB) vært nærmest enerådende som parametre for fekal forurensing, men det er for tida en øking i bruken av *fekale streptokokker* (FS) og *sulfitreduserende klostridier* (SK) til samme formål.

Det må presiseres at hovedsaken ved en bakteriologisk-hygienisk undersøkelse av vann er å finne ut *om vannet er tilført avføring*. Dersom vi påviser indikatorbakterier i vannet, kan vi slå fast at det er tilført avføring, men er det dermed sagt at det er *farlig* å drikke vannet? Nei, det er bare relativt få mennesker og dyr i vårt land som skiller ut patogene agens med avføringa. Påvising av indikatorbakterier i vann forteller likevel at det er en mulighet, en risiko, for at vannet er smittefarlig. Og det er denne muligheten som er utgangspunktet når man skal foreta en hygienisk vurdering av vannet. Fersk, fekal forurensing, vist ved f.eks. forekomst av termostabile koliforme bakterier, tolereres *ikke* i vann som skal drikkes.

Omtale av de ovenfor nevnte indikatorbakteriene blir det viktigste i dette innlegget. I tillegg vil noen andre foreslåtte indikatorbakterier og -virus og visse andre tester bli nevnt summarisk.

Grupper av mikrober som er uønska i vann

Alt vann inneholder mikroorganismer, så sant det ikke er sterilisert. De fleste aktuelle mikrobenes er uskadelige både

sett fra en helsemessig og en teknisk synsvinkel, men noen grupper er uønska i bruksvann. Dette gjelder de mikroorganismene som:

1. overfører sjukdom
2. indikerer forekomst av fekal forurensing
3. ødelegger produkter (næringsmidler, industriprodukter)
4. ødelegger utstyr (korrosjon, begroing)

I dette innlegget er det bare de mikrobenes som kommer inn under punkt 2. som vil være av interesse.

Krav til indikatorbakterier

Med utgangspunkt i ønsket om å påvise mulig forekomst av patogene mikrober i vannet, kan det settes opp følgende *kriterier for den ideelle indikatorbakterien for fekal forurensing*:

1. Bakterien må alltid være tilstede i feces.
2. Bakterien må være tilstede i et stort antall.
3. Bakteriens eneste reservoar må være tarminnhold.
4. Bakterien må ikke kunne formere seg ute i naturen.
5. Bakterien må være enkel å identifisere.
6. Bakterien må være genetisk stabil for de morfologiske og biokjemiske egenskaper som benyttes for å identifisere den.
7. Bakterien må ute i naturen ha bedre evne til å overleve enn de patogene bakteriene (og virus) som kan spres med drikkevann.

8. Bakterien må utvise større resistens enn de patogene bakteriene overfor de desinfeksjonsmidler som benyttes for mikrobiell vannrensing.

Det finnes ingen indikatorbakterier som fyller alle disse kravene.

De indikatorbakteriene som benyttes har alle enkelte mangler, og de passer til ulike typer vann og til undersøkelser med ulike siktemål.

Definering av mikrober i praktisk vannhygiene; artsdefinisjoner og bruksdefinisjoner

I den diagnostiske mikrobiologien benytter en det internasjonale taksonomiske systemet ved bestemming av bakterienes art (jfr. *Bergey's Manual* 1974). I vannhygiene er dette ofte en uhensiktsmessig framgangsmåte. Det er ofte av liten interesse og dertil arbeidskrevende å artsbestemme f.eks. ulike psykotrofe bakterier som ødelegger kjølt melk eller ulike sporebærere som overlever en varmebehandling og kan gi forråtning av produktene. I rutineundersøkelser er det av største interesse å få kjennskap til *antallet* av disse bakteriene som lar seg dyrke på et standardmedium og eventuelt deres *enzymatiske aktivitet*.

I arbeidet med indikatorbakterier er det praktiske *bruksdefinisjoner* som nyttes, og et resultat blir alltid relatert til det mediet og de dyrkingsbestemmelsene som har vært brukt. En refererer altså til mer eller mindre *standardiserte metoder*, og bakgrunnen for disse metodene er inngående vitenskapelige studier der en har studert samsvaret mellom det en *ønsker å påvise* (f.eks. «sikre avføringsbakterier») og det en i *realiteten* har påvist (f.eks. bakterier som gir mørkerøde kolonier etter 24 timer ved 44°C på endoagar).

Koliforme bakterier (KB)

(synonymer: totalantall koliforme bakterier; total koli).

Denne betegnelsen er definert i Norsk Standard 4751 som: «aerobe og fakultativt anaerobe Gram-negative, ikke sporedannende stavbakterier som spalter laktose under syre- og gassdannelse ved 37°C innen 48 timer». Denne definisjonen er internasjonalt anerkjent. (I nyere artikler har det imidlertid vært nytta en kortere definisjon: «oxydase-negative laktoseforgjærere»).

Betegnelsen koliforme bakterier er vanligvis blitt benytta om de fire slektene *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* og *Enterobacter* og eventuelle mellomformer, men som kjent lar ikke naturen seg sperre inne av presise definisjoner. F.eks. finnes det stammer innen de nevnte slektene som *ikke* spalter laktose eller som spalter laktose seint. Slike stammer vil dermed falle utenfor definisjonen. For den sentrale arten i gruppa, *Escherichia coli*, angir *Edwards og Ewing* (1972) at ca. 10% er laktose negative. Disse laktose-negative *E.coli* blir derfor ikke registrert som koliforme bakterier.

Når man i praksis undersøker vann for innhold av KB ser man ofte bort fra enkelte av definisjonens krav. Gramfarging foretas sjelden, vekst under anaerobe forhold undersøkes ikke, og ved membranfiltermetoden (MF) registreres ikke gassdannelse. Samtidig stiller mediet i seg sjøl en del krav til mikrobenes som skal vokse på det. Mediene er oftest tilsatt selektive komponenter, bl.a. gallsalter, som vil hemme veksten av uønska bakterier, men som også til en viss grad vil hemme de koliforme bakteriene. Når man bruker selektive medier for kvantitative bakteriologiske undersøkelser, må

man altså gå ut fra at man ikke får registrert alle dem det letes etter. Det er nevnt ovenfor at evnen til å spalte laktose er vesentlig for at en bakterie skal klassifiseres som «koliform». Undersøking med hensyn på laktose spalting benyttes ved alle tester for påvisning av koliforme bakterier.

Når man undersøker f.eks. vann for innhold av KB, vil man avhengig av metoden, kunne påvise bakterier som *ikke* nødvendigvis stammer fra nylig tilført feces. Dette kan være 1) bakterier av andre slekter enn de nevnte (f.eks. *Aeromonas*), men det kan også være *Klebsiella*, *Citrobacter* eller *Enterobacter* som 2) har overlevd og funnet seg til rette i miljøet eller 3) som stammer fra andre kilder enn varmbloedige organismer. Av disse grunner er KB i visse sammenhenger en usikker parameter for *fersk* fekal forurensing.

Som oftest er det imidlertid svært god overensstemmelse (korrelasjon) mellom mengden av KB og mengden av fersk fekal forurensing i ei vannprøve, og en må ikke se bort fra funn av KB uten at en er sikker på at opprinnelsen ikke er fekal. Artsmessig bestemmelse kan være til hjelp i slike tilfeller (jfr. *Aeromonas* som gir falske positive koliforme kolonier på m-endoagar). Andre ganger må en kjenne til hva slags utslipp som tilføres vannkilden, f.eks. kan utslipp fra treforedlingsbedrifter inneholde store mengder *Klebsiella* (10^4 — 10^6 pr. ml.).

Dersom man ønsker å artsbestemme isolerte koliforme bakterier, er det vanlig å benytte IMViC-testene (indol, metylrødt, Voges Proskauer og citrat). Kombinasjonen av positive og negative reaksjoner avgjør om den registrerte bakterien skal reknes for å være av fekal opprinnelse eller ikke. Ved undersøking av 7000 ko-

liforme*) bakteriestammer fra feces fra mennesker og husdyr fant *Geldreich m.fl.* (1962) at bakterier med seks ulike IMViC-mønstre var ansvarlig for 99% av isolerte KB i fecesprøvene. De seks mønstrene var:

+ + — — (Escherichia)
 — — + + (Klebsiella/Enterobacter)
 + + + —
 — + — —
 — + — + (Citrobacter)
 + + — +

I alt ble stammer med 12 ulike IMViC mønstre isolert blant KB fra feces, og størst variasjon var det i feces fra menneske.

Termostabile koliforme bakterier

(Synonym: Termotolerante koliforme bakterier; fekale koli; *Escherichia coli* I).

Norsk Standard 4751 definerer termostabile koliforme bakterier som «koliforme bakterier som spalter laktose under

syre og gassdannelse ved 44°C og spalter tryptofan under indoldannelse ved samme temperatur».

Prinsippet med differensiering av koliforme bakterier på grunnlag av vekst og sukkerforgjæring ved forhøyet dyrkings-temperatur ble foreslått av *Eijkman* i 1904. Derav navnet *Eijkmans* test. Temperaturen som benyttes i dag varierer fra 43,5°C til 46°C og Norsk Standard benytter 44,0 ± 0,2°C med 2 døgn inkubasjon.

Ved å kombinere *Eijkmans* test med IMViC systemet, kan en sette opp et nomenklaturforslag som ennå i dag benyttes endel. (I Danmark er det vanlig brukt og refereres i de danske standard-metodene).

Ved å endre IMViC til IMVEC (der «E» står for *Eijkmans* test) får en samtidig en bokstavs sammensetning som letter bruken av dette systemet (mnemoteknikk = husketeknikk). Dette er bl.a. foreslått av *Mossel* (1977).

Tabell 1. Nomenklatur for koliforme bakterier

	I	M	V	E	C	Smelting av gelatin
<i>Escherichia coli</i> I	+	+	—	+	—	—
» » II	—	+	—	—	—	—
» » III	+	+	—	—	—	—
<i>Citrobacter freundii</i> I	—	+	—	—	—	—
» » II	+	+	—	—	+	—
<i>Klebsiella aerogenes</i> I ¹⁾	—	—	+	—	+	—
» » II ¹⁾	+	—	+	—	+	—
» cloacae ¹⁾	—	—	+	—	+	+

¹⁾ Bevegelige stammer med tilsvarende reaksjonsmønster betegnes *Enterobacter*.

Kilde: The Coli-Aerogenes Sub-Committee (1956).

*) «Koliforme bakterier» er i denne sammenheng bakterier som vokser med typiske kolonier på m-Endoagar ved 35°C og dessuten produserer gass på brilliantgrønt-laktosegallesaltbuljong ved samme temperatur.

Det må presiseres at denne nomenklaturen ikke samsvarer med Bergey's Manual på alle punkter. I Bergey's Manual defineres *E. coli* som indolpositiv, og defini-

sjonene bygger på flere tester enn de fem IMVEC reaksjonene. Eijkmans test benyttes *ikke*.

Tabell 2. *Differensiering av koliforme bakterier i henhold til Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. utgave, 1974*

	Bevegelighet	Gass fra glukose (37°C)	Syre fra laktose	Indol	Methylrødt	Voges Proskauer	Citrat	H ₂ S prod. (TSI)	Urease	Gelatinase	Lysin-dekarboksylase	Ornitindekarboksylase	Fenylalanin-deaminase	Vekst på KCN-medium
<i>Escherichia</i> (+)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	d	-	-
<i>Citrobacter</i>	+	+	+(-)	D	+	-	+	D (+)	-	-	d	-	-	+
<i>Klebsiella</i>	-	d	+(D)	d	-(D)+(D)	d	d	-	d (d)	d	-	-	-	+
<i>Enterobacter</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	(d) (+)	(+)	D	+	-	+
				I M Vi C										

- D = ulike reaksjoner hos forskjellige arter innen samme genus
 — (D) + (D) = de fleste eller viktigste artene innen genus er negative henholdsvis positive
 d = ulike reaksjoner hos ulike stammer eller serotyper
 (+) og (—) = angir at det kan være visse stammer som adskiller seg som antydnet.

Eijkmans test er sannsynligvis den enkelttest som er best egnet til å fange opp de fekale koliforme bakteriene som er til stede. Dette er vist av *Geldreich m.fl.* (1962) (Tabell 3). EC-buljong

(*Escherichia coli*-buljong) er en selektiv buljong som brukes i henhold til Standard Methods (1975) (amerikansk metode-samling).

Tabell 3. *Fekale koliforme bakterier testa for vekst med gassproduksjon fra laktose på selektive medier ved forhøya dyrkingstemperatur (Eijkmans test).*

Medium	Temperatur	Inkubasjonstid	Prosent positive
EC-buljong	44,5 ± 0,25	24 t	96,3

Det er med andre ord bare 3,7% av de koliforme bakteriene en ikke får registrert ved å bruke Eijkmans test (og EC-buljong). Norsk Standard 4751: «Metoder for bakteriologisk undersøkelse av

drikkevann» benytter Eijkmans test med brilliantgrøntlaktosegallesaltbuljong (BGLG). I tillegg tester en for indolproduksjon ved 44°C før en kaller den påviste bakterien for en termotabil koli-

form bakterie. Det er ikke undersøkt hvor stor andel av de fekale koliforme bakteriene som lar seg registrere ved bruk av Norsk Standard.

Når man skal vurdere en laboratorie-test mot den virkeligheten testen skal gi et bilde av, er det vanlig å opplyse om «falske negative» og «falske positive» reaksjoner. Eijkmans test (med EC buljong) gir 3,7% falske *negative*.

De *falske positive* er det mer problematisk å få rede på. Det er de TKB som registreres og som *ikke* stammer fra fersk fekal forurensing. Størstedelen av de termostabile koliforme bakteriene er *Escherichia coli* og dette er sikre avføringsbakterier. Men, det er også vist at noen andre enterobakterier kan være termostabile, og de kan komme fra andre kilder enn avføring. Dette er antakelig ikke et problem under våre klimatiske forhold, men under tropiske eller subtropiske himmelstrøk er det vist å gi vansker.

De koliforme bakterienes naturlige reservoar.

Opplysningene til dette avsnittet er henta fra *Bergey's Manual* (1974)

Escherichia

Finnes i nedre delen av tarmkanalen hos varmblodige dyr. De fleste (alle?) typene viser opportunistisk patogenitet (f.eks. urinvegsinfeksjoner hos menneske og mastitt hos ku). Visse serotyper gir infeksjøs enteritter hos barn og unge dyr, og de såkalte enteropatogene *E.coli* (EEC-stammer) gir salmonelloselignende mage-tarmbetennelser og er en viktig årsak til «turistdiaré».

Citrobacter.

Finnes i vann, næringsmidler, avføring og urin. Patogenitet usikker. Synes å ha normal forekomst i tarmen og finnes regelmessig hos friske mennesker. Visse serotyper synes å opptre ved matbårne infeksjoner, og ved infeksjoner i urinvegene, galleblæra, mellomøret og hjerne-hinnene.

To arter, *C. freundii* og *C.intermedius*.

Klebsiella.

K. pneumoniae er vidt utbredt i naturen, i jordsmonn, vann, forstoffer etc. og er vanlig å påvise i tarmkanalen hos mennesker og dyr. Også isolert fra mange ulike lidelser hos homo, f.eks. i luftvegene og urinvegene. De to andre oppførte artene, *K.ozzaenae* og *K.rhinoscleromatis* isoleres bare ved sine respektive lidelser hos menneske (ozena som er en respirasjonslidelse og rhinoscleroma som er en lidelse i nesehulen). I tillegg er det funnet endel klebsiellalignende organismer i planter og jordsmonn, hvor de ser ut til å være nitrogen-fikserere. Det er ennå ikke avgjort om disse skal rubreres under *Klebsiella*.

Enterobacter.

E.cloacae finnes i avføring fra menneske og andre dyr, i kloakk, jordsmonn og vann. Av og til påvist i urin, puss og annet patologisk materiale fra dyr.

E.aerogenes finnes i avføring fra menneske og dyr, kloakk, jordsmonn, vann og meieriprodukter.

Fekale streptokokker.

Definisjon

Fekale streptokokker (FS) er betegnelsen på alle streptokokker som forekom-

mer i tarmen hos mennesker og varmblodige dyr.

FS som indikator på fekal forurensing

Fekale streptokokker har vært vanlig brukt som indikator på fekal forurensing i flere tiår. De har ikke fått utstrakt anvendelse her hjemme, i hvert fall ikke ved vannundersøkelser, men i utlandet er det ved siden av KB og TKB en mye anvendt parameter.

I Norge (og Norden forøvrig) er det en økende interesse for FS som parameter, og standardmetode er under utarbeiding på nordisk basis. Interessen er særlig knytta til FS som *supplement* til KB og TKB. Forholdstallet TKB/FS kan dessuten antakelig si noe om opphavet til forurensinga, om det er fra mennesker eller fra andre varmblodige dyr. Dette forutsetter antakelig bruk av andre medier enn dem som brukes hos oss nå, og det pågår mye forskning på feltet (se *Geldreich* 1976).

Nomenklatur og systematikk

Fysiologiske kriterier

På bakgrunn av en rekke fysiologiske reaksjoner inndelte *Sherman* (1937) streptokokkene i fire hovedgrupper, nemlig «pyogene streptokokker», «viridans-streptokokker», enterokokker» og «melkesyre-streptokokker».

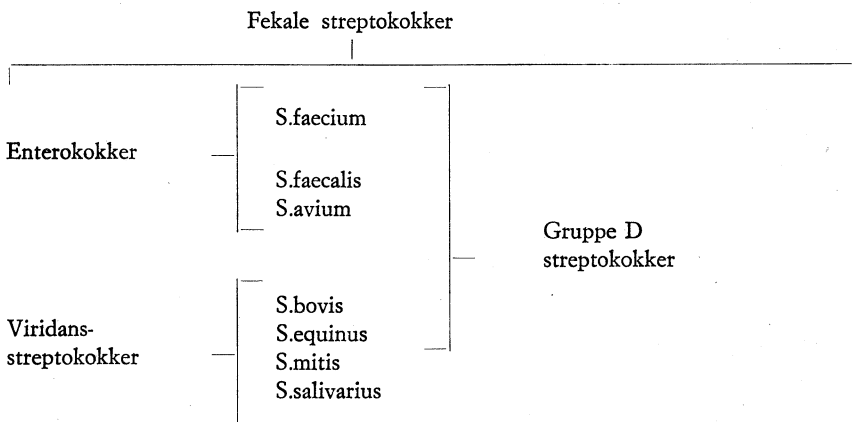
Serologiske kriterier

Lancefield (1933) har utarbeidd et system for differensiering av streptokokkene på grunnlag av somatiske antigener av polysakkaridnatur. Disse gruppene har fått betegnelsen A, B, C etc. Innen hver gruppe kan det være flere arter.

Hvilke arter de ulike betegnelsene omfatter

Ulike betegnelser benyttes ofte om hverandre og som synonyme. Dette gjelder *fekale streptokokker*, *enterokokker* og *gruppe D-streptokokker*. Forholdet mellom disse gruppene kan sees av Figur 1 (*Levin* m.fl. 1975).

Figur 1.



Grappa fekale streptokokker omfatter bakterier med ulik opprinnelse. To arter finnes i avføring fra både mennesker og varmblodige dyr (*S.faecium* og *S.faecalis*), tre arter finnes bare i avføring fra varmblodige dyr (*S.bovis*, *S.equinus* og *S.avium*) og to arter finnes hovedsakelig i menneskets munnhule og svelg (*S.mitis*, *S.salivarius*). En har medier som kan skille mellom disse gruppene. Dermed er det mulig å få et tallmessig uttrykk for sammensetningen av de fekale streptokokkene i ei vannprøve.

m-enterococcus agar (Slanetz og Bartley 1957) er vanlig brukt i Norge. Omtales i Sandviks «Medier, reagenser og metoder» (NVH 1967). Det oppgis å være 100% selektivt for enterokokker (*S.faecalis* og *S.faecium*). Om *S.avium* vokser på mediet er imidlertid uklart. En må regne med at endel enterokokker også blir hemma av dette mediet, hvor stor andel dette gjelder, er uklart.

PSE-streptococcus agar anbefales av *Standard Methods* (1975) og gir god vekst av bl.a. *S.bovis* og *S.equinus* foruten enterokokkene. Mediet kan brukes når en ønsker kjennskap til om vannet er forurenset med fekalier fra dyr. Mediet kan gi visse problemer fordi det tillater oppvekst av andre bakterier (*Corynebacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus lactis*).

MPN-metode

Det er også beskrevet en rørmetode (MPN-metode) for fekale streptokokker i *Standard Methods* (1975). Den innebærer bruk av Na-azid-dekstrose-buljong til presumptiv prøve, 35°C (37°C) i 48 t., deretter konfirmativ prøve på etylfiolett-azid-buljong ved 35°C (37°C) i 48 t.

Differensiering av fekale streptokokker

I henhold til *Bergey's Manual* (1974) differensieres FS etter følgende kriterier:

Tabell 4.

	Vekst ved		Vekst i medier som inneholder			Vekst ved pH 9,6	Termostabilitet (60°C i 30 minutt)
	10°C	45°C	1% methylenblått i melk	6,5% NaCl	40% galle		
<i>S.faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>S.faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>S.bovis</i>	-	+	-	-	+	-	+
<i>S.equinus</i>	-	+	-	-	+	-	-
<i>S.avium</i>	+	+	-	+	I.D.	+	I.D.
<i>S.salivarius</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>S.mitis</i>	-	d	-	-	-	-	-

I.D. = ingen eller utilstrekkelige data

d = noen stammer positive, noen negative

Omtale av de enkelte artene

S.faecalis finnes i avføring fra mennesker og varmblodige dyr. Vanlig i mange

matvarer, ofte uten sammenheng med direkte fekalforurensning. Fins ofte på planter som epifyter (d.v.s. uten skade

for planten). Det er omdiskutert om bakterien kan være årsak til matforgiftning.

Isoleres stundom fra urinvegsinfeksjoner og ved subakutt endokarditt.

Tabell 5. Overleving (i %) av tilsatt mengde av bakterier i filtrert bakteriefritt regnvann.

	Oppholdstid i døgn					
	10°C			20°C		
	1	7	14	1	7	14
<i>Streptococcus faecalis</i>	95	73	50	72	26	16
<i>Streptococcus bovis</i>	0,1	÷	÷	10	0,17	÷
Termostabile kolif.bakt.	80	18	3,5	18	1,2	0,27
<i>Salmonella typhimurium</i>	55	11	4,8	14	1,3	0,81

÷ = ikke påvist

(Tabellen er satt opp i henhold til kurver i artikkel av *Geldreich og Kenner*, 1969).

S. faecalis viser stor overlevelsessevne i vann i naturen, jfr. Tabell 5. Dette er antakelig det største problemet ved bruk av fekale streptokokker som indikator på fersk fekal forurensing.

Underarter: *S. faecalis faecalis*
S. faecalis liquefaciens
S. faecalis zymogenes

S. faecium. Samme kilder og habitat som *S. faecalis*. Den tidligere oppførte arten *S. durans* er i siste *Bergey's Manual* regnet som identisk med *S. faecium*.

S. avium. Karakteristisk for avføring fra kyllinger. Av og til i faeces fra menneske, hund og gris.

S. bovis. Finnes i fordøyelsestraktus hos storfe, sau og andre drøvtyggere. Av og til i store mengder i feces fra menneske. Av og til isolert fra tilfeller av human endokarditt. Påvisning av *S. bovis* i vann tolkes som sikkert tegn på tilførsel av avføring fra varmblodige dyr. Forekomsten i human feces regnes ikke for signifikant i denne sammenhengen (*Levin m.fl.*, 1975).

S. bovis går svært raskt til grunne utenfor organismen. Den regnes derfor som tegn på fersk fekal forurensing.

S. equinus. Dominerende streptokokk i fordøyelsestraktus hos hest, og påvisning i vann tolkes som sikkert tegn på tilførsel av avføring fra varmblodige dyr. Går raskt til grunne utenfor organismen, og regnes derfor som indikasjon på fersk fekal forurensing.

S. mitis. Respirasjonstraktus, spytt, oppspytt og avføring fra menneske. Denne bakterien regnes i hovedsak å være indikator på forurensing fra menneskets respirasjonsorganer. (*Mossel* 1977).

S. salivarius. Finnes hos menneske i munnens slimhinner, i respirasjonstraktus, i spytt og i feces.

Konklusjoner om fekale streptokokker (FS)

1. Forekomst av fekale streptokokker i vann indikerer fekal forurensing.
2. Overleving i vannmiljøet varierer mye fra art til art. Bl.a. *S. faecalis* overlever

betraktelig lenger enn f.eks. termostabile koliforme bakterier (TKB) og *Salmonella typhimurium*.

3. Noen stammer er av begrensa hygienisk betydning. Dette er stammer av *S.faecalis* som lever epifytisk på vegetasjon.
4. Påvising av *S.salivarius* eller *S.mitis* indikerer forurensing fra human kilde.
5. Påvising av *S.bovis* eller *S.equinus* indikerer forurensing fra varmblodige dyr.
6. Påvising av *S.bovis* eller *S.equinus* indikerer svært nylig tilført fekal forurensing idet disse går raskt til grunne i vannmiljøet.
7. Dersom mengden FS overskrider 100 pr. 100 ml og det bare har gått få timer siden utslippet er tilført vannforekomsten, kan forholdstallet TKB/FS brukes som indikator på kilden til forurensing.
(Forutsetningen er at en bruker spesielle medier, jfr. *Geldreich* 1976).
8. De ulike mediene som er tilgjengelige selekterer ulike arter av de fekale streptokokkene.
9. For metoder for påvising av fekale streptokokker henvises til *Standard Methods* (1975).

Sulfittreducerende klostridier (SK)

Definisjon

Sulfittreducerende klostridier (SK) er Gram-positive sporedannende stavbakterier som vokser anaerobt og reduserer sulfitt til sulfid ved inkubasjon ved 44—48°C i løpet av 24 timer.

Forholdet til *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens er en av de tradisjonelle indikatorbakteriene for fekal forurensing. Av praktiske årsaker under-

søker en ved den metoden som er vanlig brukt hos oss *ikke* spesielt for *C.perfringens*, men tar utgangspunkt i en særlig egenskap som bakterien har, nemlig evnen til å redusere sulfitt til sulfid. Under anaerobe forhold vil sulfiden (H_2S) reagere med toverdige jernioner og felles ut som en svart sky av jernsulfid 1—2 mm i diameter rundt kolonien.

I tillegg til *C.perfringens* er det også andre bakterier som er sulfittreducerende. Det gjelder visse *Bacillus*arter, fekale streptokokker, visse *Proteus*- og *Salmonella*-arter, men disse vil ikke bli registrert med den metoden som benyttes, nemlig med anaerobe forhold, 1% sulfittkonsentrasjon i mediet og 44—48°C inkubasjonstemperatur. I praksis er det bare andre klostridier som interfererer, hvorav noen har tarmen som sitt reservoar og dermed også er indikatorer på fekal forurensing.

Professor Bonde ved Hygienisk Institutt i Århus har arbeidet mye med sulfittreducerende klostridier som indikator på fekal forurensing, og danskenes standard (DS 265 fra juni 1974) har en metode for påvising av sulfittreducerende klostridier som bygger på Bondes forslag (*Bonde* 1963). Bonde undersøkte i hvilken grad det virkelig var *C.perfringens* som ble registrert ved bruk av hans metode. Resultatene er referert i Tabell 6.

Undersøkelser foretatt ved Institutt for næringsmiddelhygiene, Norges veterinærhøgskole, peker i samme retning (*Mære og Hellesnes*, under arbeid) (I denne undersøkelsen ble det brukt 44°C inkubasjonstemperatur og prosent kolonier som *ikke* lot seg bestemme som *C.perfringens* var for fullrensa kloakkvann og forurensa elv henholdsvis 19% og 32%).

Tabell 6. Konfirmering av *C.perfringens* ved undersøkning av ulike prøver for innhold av sulfittreduserende klostridier. (Etter Bonde, 1963).

	Feces	Rå- kloakk	Kloakk- slam	Rensa kloakk- vann	Resi- pient- vann
Antall undersøkte kolonier fra jernsulfittagar, 48°C, 24 timer (etter sekundær dyrking på anaerob buljong)	20	146	418	257	266
Kolonier med typisk morfologi	20	146	412	254	227
Antall kolonier som ikke lot seg verifisere som <i>C.perfringens</i>	0	3	29	10	73
Prosent kolonier som ikke lot seg verifisere som <i>C.perfringens</i>	0	2	6,7	3,9	31

SK som indikator på fekal forurensing

Det er vanligvis færre *C.perfringens* i feces fra varmblodige organismer enn termotabile koliforme bakterier og fekale streptokokker. Dette gjør sulfittreduserende klostridier til en mindre følsom indikator ved små forurensingstilførsler enn de to andre.

C.perfringens er i motsetning til koliforme bakterier og streptokokker anaerob og vil ikke vokse dersom det er oksygen til stede. Dette kompliserer laboratoriearbeidet med denne bakterien, men med metoden som er i bruk (jfr. *Dansk Standard* 265.1., 1974) er ikke dette en vesentlig innvendig.

C.perfringens har en annen vesentlig egenskap som gjør den prinsipielt forskjellig fra andre indikatorbakterier, og det er evnen til sporedanning. Sporene er motstandsdyktige mot ulike miljøfaktorer og gir bakterien lang overleving både i naturen og i uttatte prøver. I naturen medfører dette at det er vanskelig å tidfeste forurensingen, men dersom en samtidig

foretar undersøkning for TKB og FS kan forholdet mellom mengdene av de tre indikatororganismene gi en peikepinn på alderen av tilførselen. SK kan avsløre en tilførsel som har foregått for ei tid tilbake.

Transport og lagring av prøver til bakteriologisk undersøkning er ofte et problem. Det kan gå for lang tid mellom uttak og undersøkning slik at resultatet blir misvisende. Dette unngår en ved undersøkning for SK. Som vist av *Mære & Hellesnes* (under arbeid) kan prøveflasker lagres kjølig i flere uker uten at registrerbar mengde sulfittreduserende klostridier endres vesentlig.

C.perfringens har sin naturlige forekomst i tarmen på varmblodige organismer. Her vil den også danne sporer, noe den meget sjelden gjør i laboratoriekulturer. Det må brukes spesielle dyrkingsmetoder for å oppnå sporulering av denne mikroben utenfor tarmkanalen. *C.perfringens* viser større resistens overfor miljøfaktorer (f.eks. salt i vann) og ulike rensiltak enn de andre tradisjonelle indika-

torbakteriene. *Bonde* (1963) slår fast at dette både gjelder sporene til *C.perfringens* og de vegetative cellene.

Sulfittreducerende klostridiers naturlige reservoar

C.perfringens er ifølge *Bergey's Manual* isolert fra jordsmonn, marine sedimenter, sår og feces. Det er uenighet om *C.perfringens* kan formere seg i naturen utenfor tarmkanalen. Når den påvises på steder der det ikke er kjent tilførsel av avføring, er det i små mengder og oftest i form av de resistente sporene. *C.perfringens* kan isoleres fra mange ulike miljøer og *Bonde* (1963) mener at den kan betegnes som ubiquitous. Han slår imidlertid samtidig fast at på basis av hans omfattende undersøkelser må det antas at bakteriens naturlige habitat er tykktarmen hos varmblodige dyr (skjønt den er ikke påvist fra alle dyrearter). Forekom-

sten i naturen er primært avhengig av tilførsel av fekal forurensning.

Bakterier av arten *C.perfringens* produserer en rekke ulike toksiner som betegnes med greske bokstaver fra α (alfa) til μ (my). Typeinndeling av *C.perfringens* foretas på grunnlag av hvilke toksiner som produseres, og en opererer med fem typer med betegnelsene A, B, C, D og E (se *Fabianson og Nordmark* 1976). Hver av disse typene er årsak til spesifikke sjukdommer, særlig hos kalv og lam. Betegnelsen enterotoksemier brukes om mange av lidelsene og det antyder at toksinene produseres i tarmen, hvorfra de suges opp til blodet og utøver sin virkning rundt om i organismen.

C.perfringens type A er dessuten kjent som årsak til en næringsmiddelintoksikasjon (matforgiftning) på mennesker. Toksinet dannes når bakterien sporulerer i tarmen etter konsum, inkubasjonstida er 6—12 timer og symptomene er knytta

Tabell 7. Klostridier som kan gi svarte kolonier på jernsulfittagar ifølge *Marchall m.fl.* (1965).

Navn	Påvist i feces*)	Andre påvisningssteder*)
<i>C. perfringens</i>	x	jordsmonn, sår marine sedimenter a
<i>C. pasteurianum</i>		jordsmonn
<i>C. bifermentans</i>	x	jordsmonn, ferskvann, marine sedimenter
<i>C. subterminale</i>		jordsmonn, sår
<i>C. sporogenes</i>	x	jordsmonn, sår, matvarer (hermetikk)
<i>C. butyricum</i>	x	jordsmonn, ost, naturlig syrna melk
<i>C. novyi</i>	x	jordsmonn, sår, marine sedimenter
<i>C. lactoacophilum</i>	Nevnes ikke i <i>Bergey's Manual</i> (1974)	
<i>C. aerofoetidum</i>	»	»
<i>C. butylicum</i>	»	»

*) Ifølge *Bergey's Manual* (1974)

til nedre del av fordøyelsestraktus med diaré og magesmerter som det vanligste. Her i landet er det oftest kjøttholdige retter (lapskaus) fra storhusholdninger som har gitt *C.perfringens*-matforgiftning, især dersom maten blir langsomt nedkjølt og/eller oppvarmes flere ganger.

Det er ingen grunn til å tro at *C.perfringens*-matforgiftning skyldes fekal forurensa vann, så de to feltene der denne mikroben har betydning innen næringsmiddelhygien, nemlig som indikator på fekal forurensing av vann og som årsak til matbåren sjukdom, må sees på som to ulike problemområder.

Metoder

Det er ikke utgitt Norsk Standard for påvisning av sulfittreducerende klostridier eller *C.perfringens* og heller ikke *Standard Methods* (1975) angir dette. *Dansk Standard 265* angir metode for SK på basis av *Bondes* (1963) anvisninger, og *Mære og Hellesnes* (under arbeid) angir en noe forenkla metodikk som kan benyttes. For påvisning av SK i næringsmidler, angir Nordisk Metodikkomiteé for næringsmidler en metode som bygger på samme prinsipp (NMK metodikk nr. 56, 1965).

Forøvrig er det beskrevet en rekke andre metoder for kvantifisering av SK og *C.perfringens* i vannmiljø. Både WHO, den internasjonale standardiseringsorganisasjonen ISO og den nordiske standardiseringskomiteén for vannundersøkelser arbeider med dette, og det vil innen få år være utarbeidd standardmetodikker.

Den metoden som for øyeblikket ser mest lovende ut for *C.perfringens* i vannmiljø, er en platespredningsmetode ved bruk av et medium (TSC-agar) som inneholder antibiotikumet D-cycloserin. (*Fabianson og Nordmark* 1976).

Konklusjoner om sulfittreducerende klostridier (SK) i vann

1. Forekomst av sulfittreducerende klostridier i vann indikerer fekal forurensing.
2. Undersøking for SK kan være et supplement til undersøking med hensyn på termostabile koliforme bakterier. Særlig gjelder dette prøver av vann som er klorert eller underkasta annen desinfisering, og vann som kan inneholde toksiske komponenter (avløpsvann).
3. Test for SK bør foretas på prøver som har hatt lang transport- eller lagringstid (over 12 timer) eller prøver som har vært oppbevart i ugunstig miljø (f.eks. varmt).
4. Ved mistanke om periodevis eller tidligere fekal forurensing bør test for TKB suppleres med SK.
5. SK er nyttig ved undersøking av et utslipps utbredelse og konsentrasjon i en resipient («tracer»). (Se Kjos-Hansen 1977).
6. SK kan brukes som mål på i hvilken grad akvatiske sedimenter stammer fra kloakkutslipp. (Se Kjos-Hansen 1977).

Andre parametere av hygienisk karakter

Bifidobakter

Bifidobakterier er blitt foreslått som indikatorer på fekal forurensing fordi de forekommer i stort antall i feces, oftest 10—100 x flere enn *E.coli*. De finnes ikke i miljø som ikke er forurensa med fekalier, de lar seg dyrke ved relativt enkle metoder, og de vil, i motsetning til visse koliforme bakterier, ikke oppformerer i temperert og tropiske vann-

kilder p.g.a. krav til strikt anaerobe vekstforhold.

Fordelen med bifidobakteriene er at de er de mest humanspesifikke blant indikatorbakteriene. De kan derfor brukes for å skille mellom human og animal forurensing, og de ulike artene synes å ha en klar fordeling mellom ulike aldersgrupper.

Hovedinnvendingen mot å undersøke vann for innhold av bifidobakter, er det faktum at metoden er mer omstendelig enn f.eks. *E.coli*. Dessuten er bifidobakteriene mer sensitive for miljøpåvirkninger enn andre indikatorbakterier.

Konklusjonen er at bifidobakteriene er interessante i vannhygienisk sammenheng, men at mer forskning må foretas før en tar stilling til praktisk utnytting av denne parameteren (*Evison og Morgan, 1978*).

Aeromonas av hydrophila-punctata gruppa

Schubert har publisert en rekke arbeider der han drøfter forekomsten av ulike

bakteriegrupper innen genus *Aeromonas* i vann bl.a. i hygienisk sammenheng (se *Schubert 1976*). Det gjelder det han kaller «hydrophila-punctata gruppa» som omfatter fire typer (2 arter og 2 underarter). Artene *A.hydrophila* og *A.punctata* produserer syre og gass ved forgjøring av glukose (de er *aerogene*), mens underartene *A.hydrophila anaerogenes* og *A.punctata caviae* produserer bare syre av glukose (de er *anaerogene*).

Aeromonas forekommer i stort antall i kloakkpåvirkta vann og de anaerogene artene er i sterk overvekt i slikt vann. Som Tabell 8 viser, varierer mengdene fra $7,3 \times 10^8$ pr. ml i kloakkvann og til $2,8 \times 10^3$ pr. 100 ml i svært lite forurensa «tropiske fjellbekker».

Vannforekomstene er her karakterisert etter deres forurensingsgrad ved det såkalte *saprobie-systemet* (om dette, se *Jørgensen 1977*).

Når man undersøker den prosentvise fordeling av *Aeromonas* mellom aerogene og anaerogene stammer, får en følgende tall, se Tabell 9.

Tabell 8. Forekomst av *Aeromonas* i ulike vannmiljøer

Vanntype	Antall prøver	Middelverdi pr. 100 ml
Bykloakkvann	4	$1,6 \times 10^8$
»	4	$7,3 \times 10^8$
Polysaprobt elvevann	4	$9,1 \times 10^5$
α -mesosaprobt elvevann	5	$7,9 \times 10^4$
β -mesosaprobt elvevann	5	$5,1 \times 10^4$
Oligosaprobt elvevann	5	$2,4 \times 10^4$
Tropisk fjellbekk	2	$2,8 \times 10^3$

(Fra *Schubert 1976*).

Tabell 9. Prosentvis fordeling av aerogene og anaerogene *Aeromonas* i ulike vannmiljøer.

Vanntype	Antall prøver	Prosent aerogene <i>Aeromonas</i>	Prosent anaerogene <i>Aeromonas</i>
Bykloakkvann	4	26	74
»	4	17,3	82,7
Polysaprobt elvevann	4	28,5	71,5
α -mesosaprobt elvevann	5	38,8	61,2
β -mesosaprobt elvevann	5	42,6	57,4
Oligosaprobt elvevann	5	96,2	3,8
Tropiske fjellbekker	2	97	3

(Fra Schubert 1976).

Schuberts konklusjoner på sine undersøkelser er at mengden av *Aeromonas* i et forurensa vann kan være et mål på kloakkpåvirkning og at forholdet mellom aerogene og anaerogene *Aeromonas* kan beskrive saprobielstanden bedre enn det etablerte saprobiesystemet.

Utvikling av praktisk gjennomførbare metoder for bruk av *Aeromonas* i hygienisk sammenheng gjenstår.

Et viktig poeng i samband med undersøkning for koliforme bakterier er at endel stammer av *Aeromonas* forgjærer *laktose*. De aerogene stammene danner endatil både *syre* og *gass* ved forgjæringen og kan gi falske positive reaksjoner ved tester for koliforme bakterier. Alle de her omtalte artene vokser godt ved 37°C, men har maksimum veksttemperatur ved ca. 41°C (Bergey's Manual 1974).

Undersøking av Østensjøvannet i Oslo, som er sterkt kloakkpåvirka, har vist at *Aeromonas*arter oppnår masseforekomst også under norske forhold (Institutt for næringsmiddelhygiene, NVH, upublisererte resultater 1977).

Sporer av *Bacillus*-arter

Arter av slekta *Bacillus* forekommer i store mengder i avfallsstoffer og de øvre deler av jordsmonnet og dermed også i overflatevann. De vil vanligvis ikke formere seg i miljøer med lavt næringsinnhold (lite innhold av lett nedbrytbart organisk stoff), f.eks. i grunnvannskilder, men vil finnes her som sporer med stor overlevingssevne.

Dette forholdet kan, ifølge Schubert (1975), utnyttes ved hygienisk undersøkning av grunnvann. Mengden av *Bacillus*-sporer i vannet indikerer graden av tilførsel av avfallsstoffer eller overflateforurensing. Antallet *Bacillus*-sporer er uavhengig av den bakteriologiske sjørensingsgraden. Dette til forskjell fra *Pseudomonas*-arter som lett utnytter små mengder organisk stoff som måtte være til stede i slike kilder og som vil gå langsomt til grunne når dette er brukt opp. Schubert har under vest-tyske forhold registrert fra 1000 til 10 000 *Bacillus*-sporer pr. 50 ml i overflatevann og fra 0 til 5 pr. 50 ml i upåvirka grunnvann. I filtrert

grunnvann nær bredden av større elver og i kilder som er forurensa fra overflaten, er 1000 *Bacillus*-sporer pr. 50 ml eller mer påvist. Dette tallet synker dess mer en fjerner seg fra forurensingskilden, f.eks. i infiltrasjonsretningen fra større elver.

Kolifager

Endel virusarter er mer resistente overfor vannmiljøet og desinfeksjonsprosesser enn de vanlig brukte indikatorbakteriene, f.eks. *E.coli*. Dette kan føre til at vann er smittefarlig til tross for at det ikke inneholder indikatorbakterier. Det er især forskjellige *enterovira* (bl.a. poliovirus) som er aktuelle.

Av denne grunn har det vært diskutert, og forsøkt, å bruke påvisning av enterovira som hygienisk test av vann. Dette har vært komplisert og kostbart og er lite aktuelt ennå.

Til erstatning for enterovira som parameter har de såkalte *kolifager* blitt foreslått. Kolifager er vira av typene *bakteriofager*, d.v.s. vira som må trenge inn i bestemte bakterieceller for å kunne formere seg. Kolifagene er obligate parasitter i bakterier av arten *Escherichia coli*. De trenger inn i vertscella, formerer seg og frigjøres i miljøet etter lysis (ødeleggelse) av vertscella hvoretter fagene angriper nye vertsceller.

Grunnet (1976) har beskrevet en metode som bygger på MPN-prinsippet med oppforming av evt. kolifager som er tilstede i prøvevannet. Oppformeringssubstratet (med evt. fager) dryppes på en agarplate med nylig utsådd *E.coli* kultur. Tilstedeværelse av kolifager i vannet vil resultere i en «plaque» på *E.coli* kulturplata, d.v.s. et lite felt hvor *E.coli* vil være lysert. Kombinasjonen av positive

og negative vannvolumer med hensyn på plaquedannelse gir grunnlag for beregning av kolifagmengden i vannet ved hjelp av en MPN-tabell.

Påvisning av kolifager har vært benytta rutinemessig ved et anlegg i Windhoek i Namibia (Sør-Vest Afrika) hvor kloakkvann blir rensa og desinfisert så det oppnår drikkevannskvalitet (Grabow 1978). Erfaringene derfra er gode. Det er mulig dette kan bli en metode som kan supplere de tradisjonelle indikatormetodene i tilfeller der patogene enterovira er en risiko og der de antakelig overlever lenger i miljøet enn de vanlig brukte indikatororganismene.

Limulus-amøbocyt-lysat-testen (LAL-testen)

De såkalte *endotoksinene* har fått mye oppmerksomhet i den seinere tida. Dette er stoffer av lipopolysakkaridkarakter som er knytta til veggen av Gram-negative bakterieceller. Om disse finnes hos alle Gram-negative bakterier eller også hos andre mikrober, er uvisst, men toksinene fra ulike arter har ulik toksisitet. Klinisk kan endotoksinene bl.a. gi feber og blodpropp, og f.eks. ved sterilisering av utstyr og infusjonsvæsker i sjukehus er dette stoffer av stor interesse. Endotoksinene er svært resistente mot varmebehandling og kjemisk sterilisering.

Om endotoksinene har betydning i miljøhygienisk sammenheng, f.eks. ved gjenbruk av rensa og desinfisert avløpsvann eller av eutroft vann som drikkevann, er usikkert. Det er imidlertid rapportert om et sjukdomssyndrom (sjukdoms-«bilde») blant arbeidere på kloakkrenseanlegg som antakelig skyldes endotoksiner især fra *Klebsiella*, *Escherichia*

og *Enterobacter* (se *Krongaard Kristensen*, 1978).

Det finnes en metode for påvising av endotoksiner som både er sikker, enkel og uhyre følsom. Det er den såkalte limulus-amøbocyt-lysat testen (LAL). Den er oppkalt etter et saltvannsbunndyr som heter *Limulus polyphemus*, eller «hesteskokrabben». Den tilhører «sverdhale-dyra», ei gruppe som taksonomisk hører til Araknidene (edderkoppdyr), og den lever nedgravd i sanden på opptil 30—40 meters dyp langs Nord-Amerikas østkyst. Hesteskokrabben blir opptil 80 cm lang og oppnår en alder av 30 år.

I blodsystemet til *Limulus* er det en bestemt celletype som kalles amøbocyter. Lysat av disse cellene koagulerer når det er endotoksin til stede, og dette fenomenet er grunnlaget for testen. Så lite som 10^{-15} mg endotoksin pr. ml kan påvises (*Mikkelsen* 1978).

LAL-testen ble oppdaga i 1956 og anvendes i utstrakt grad over hele verden både til forskning og rutinemessig påvising av endotoksin.

LAL-testen kan vise seg svært verdifull i visse sammenhenger innen vannhygiene, men rutinemessig bruk av limulus-lysat kan vise seg skjebnesvanger for *Limulus-dyret* som allerede har fått bestanden kraftig redusert.

Koprostanol

Koprostanol (5β -kolestan- 3β -ol) dannes fra kolesterol i tarmkanalen hos pattedyr og fjørfe. Dette skjer ved kjemisk reduksjon og/eller ved hjelp av den anaerobe

Gram-negative floraen (*Martin* m.fl. 1973). Forbindelsen kan derfor brukes som indikator på fekal forurensing i vannforekomster.

Koprostanol nedbrytes sakte i vann og kan påvises i lang tid etter at det er tilført. Klor og andre giftstoffer innvirker ikke på koprostanol, og stoffet kan derfor i motsetning til indikatorbakteriene, indikere utslipp av fekalier i vann som er påvirket av slike forbindelser f.eks. fra industriutslipp (*Wun* 1976, referert etter *Berglind*, 1978).

Koprostanol brytes nærmest fullstendig ned i veldrevne kloakkrensingsanlegg og stoffet kan derfor brukes til å måle effekten av slike anlegg eller enkeltprosesser i anlegg (*Dutka* m.fl. 1974). Stoffet vil ikke holdes tilbake når vann passerer gjennom jord og andre løsmasser, dette i motsetning til indikatorbakteriene. Analyse av grunnvann og brønner med hensyn på koprostanol kan avsløre fekal påvirkning av dette sjøl om tester for indikatorbakterier er negative (*Berglind* 1978). Det er vist at det foregår en oppkonsentrering av koprostanol i marine sedimenter (*Hasset og Lee* 1977). Mengdemessige forhold kan fortelle om graden av kloakkpåvirkning i området.

Analyse av koprostanol kan foretas ved hjelp av gasskromatografi (*Berglind* 1978). Denne metoden er innarbeidd ved NIVA, men faller relativt dyr og er lite aktuell i rutinesammenheng ennå. Analysen er aktuell når bakteriologiske undersøkelser ikke bør benyttes, f.eks. ved særlig lang transporttid eller dersom vannet er påvirket av ulike toksiske forbindelser.

LITTERATURREFERANSER:

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.*
Red.: R. E. Buchanan og N. E. Gibbons; 8. utg., 1974
- Berglind, L.:* Analysemetoder for coprostanol — en indikator på fekal forurensing.
Rapport XK-20, Norsk institutt for vannforskning, 1978
- Bonde, G. J.:* Bacterial indicators of water pollution.
Avhandling, 422 s., Teknisk forlag, København 1963
- The Coli-Aerogenes Sub-Committee of the Society for Applied Bacteriology:*
The Nomenclature of Coli-Aerogenes Bacteria. *J. Appl. Bact.*, 19, 108—111, 1956; referert etter Dansk Standard 265.1., 1974
- Dansk Standard 265.1:* Udvidet bakteriologisk drikkevandsundersøgelse. 1. utg. 1974, utgitt av Dansk Standardiseringsråd.
- Dutka, B. J., A. S. Y. Chau og J. Coburn:* Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal sterols. *Water Res.*, 8, 1047—1055, 1974.
- Edwards, P. R. og W. Ewing:* Identification of Enterobacteriaceae., 3. utg., Burgess, Minneapolis, Minn., 1972.
- Eijkman, C.:* Die Gärungsprobe bei 46°C als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung. *Zentralblatt f. Bakteriol. (Orig.)* 37, 742, 1904.
- Evison, L. M. og S. Morgan:* Further studies in *Bifido*-bacteria as indicators of faecal pollution in water. IAWPR's 9. internasjonale konferanse, s. 341, Stockholm, 1978..
- Fabianson, S. og C. Normark:* Clostridium perfringens som matforgiftningsframkallare. *Svensk Vet.tidn.* 28, 687—698, 1976.
- Geldreich, E. E.:* Fecal coliform and fecal streptococcus density relationship in waste discharges and receiving waters. ERC Critical reviews in environmental control, 349—369, Oct. 1976.
- Geldreich, E. E. m.fl.:* Type distribution of coliform bacteria in the feces of warm-blooded animals. *J. Water Poll. Contr. Fed.*, 34, 295—301, 1962.
- Geldreich, E. E. og B. A. Kenner:* Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J. Water Poll. Contr. Fed.*, 41, R. 336-R. 352, 1969.
- Grabow, W. O. K., B. W. Bateman og J. S. Burger:* Microbiological quality indicators for routine monitoring for waste-water reclamation systems. IAWPR's 9. internasjonale konferanse, s. 317, Stockholm, 1978.
- Grunnet, K.:* Påvisning af colifager i spildvand og recipienter. *Vand* 1976, 7, 111—113 og 122.
- Hasset, J. P. og F. L. Lee:* Sterols in natural water and sediment. *Water Research*, 11, 983—989, 1977
- Jørgensen, G.:* Metoder for zoologisk bedømmelse av vannkvalitet s. 26—34, i «Bilag til kompendiet hydrobiologi», red.: I. Hellesnes, NVH, 1977
- Kjos-Hansen, B.:* Resipientbakteriologi. *Vann*, nr. 1, 64—70, 1977.
- Krongaard-Kristensen, Kaj:* Endotoxiner — et omgivelses-hygienisk problem? *Vand*, nr. 2, 54—56, 1978
- Lancefield, R. C.:* A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, 57, 571—595, 1933
- Levin, M. A., J. R. Fischer og V. J. Cabelli:* Membrane filter technique for enumeration of enterococci in marine waters. *Appl. Microbiol.*, 30, 66—71, 1975

- Marshall, R. S. m.fl.*: Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 13, 559—563, 1965
- Martin, W. J., M. T. Ravi Subblab, B. A. Kottke, C. C. Birk og M. C. Naylor*: Nature of fecal sterols and intestinal bacterial flora. *Lipids* 8, 208—215, 1973
- Mikkelsen, T.*: Limulus testen. *Vand*, nr. 1, 22—26 (34), 1978
- Mossel, D. A. A.*: Microbiology of foods. Occurrence, prevention and monitoring of hazards and deterioration. Utrecht universitet, 165 s, 1977
- Mære, Bjørn og Ivar Hellesnes*: Bruk av sulfittreduserende klostridier som mål på vannkvalitet. Rapport under bearbeiding, Institutt for næringsmiddelhygiene, NVH.
- Norsk Standard 4751*: Metoder for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann. 1. utg. 1976, utgitt av Norges Standardiseringsforbund.
- Sandvik, Olav*: Medier, reagenser og metoder. Kompendium, NVH, 1972
- Schubert, R. H. W.*: Der Nachweis von Sporen der Bacillus-Species im Rahmen der hygienischen Wasserbeurteilung. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B* 160, 155—162, 1975
- Schubert, R.*: Der Nachweis von Aeromonaden der «Hydrophila-Punctata-Gruppe» im Rahmen der hygienischen Trinkwasserbeurteilung. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B* 161, 482—497, 1976.
- Sherman, J. M.*: The value of the temperature limits of growth in a primary grouping of the streptococci. *Jour. Bact.* 33, 26, 1937.
- Slanetz, L. W. og C. H. Bartley*: Numbers of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J. Bact.* 74, 591—595, 1957
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Am. Public Health Ass., Am. Water Works Ass. og Water Poll. Contr. Fed./ 14. utg., Washington, 1975.