

Undersøking for fluorescerande bakteriar i vatn og hygienisk betydning av dette

Av Kristian Staveland

Kristian Staveland er veterinær fra Norges Veterinærhøgskole, 1970. Han er ansatt som avdelingsveterinær ved Stavanger off. kjøtt- og næringsmiddelkontroll.

1. INNLEIING

Funn av fluorescerande bakteriar i vatn har vorte omfatta med aukande interesse dei siste 20 åra. Grunnen er at bakteriar med denne karakteristikken samstundes er opphav til eit vidt spenn av hygieniske problem.

Ein del artar fluorescerande bakteriar er uønskte i drikkevatt fordi dei ved kontaminering kan øydeleggja næringsmiddel som lagrast ved låg temperatur. I resipientkontrollen har funn av fluorescerande bakteriar vorte tolka som at vatnet er rikt på organisk stoff (20).

Ein art innan gruppa, *Pseudomonas aeruginosa* vert sett på som ein helse- risiko i badevatn. Vidare har det kome forslag om å nytta denne bakterien som indikator på human fekal forureining i vatn (2, 15).

2. FLUORESCEIN OG FLORESKERANDE BAKTERIAR

Fluorescein er eit gulgrønt pigment som løyser seg i vatn og fluorescerar (lyser) i ultraviolett lys. Fargen på pigmentet endrar seg med pH slik at den gulgrøne fargen berre kjem fram i alkaliske løysingar (omslag rundt pH 7) medan det er fargelaust i sur løysing (17). Under visse vilkår produserar ein del bakterietypar

dette fargestoffet, og taksonomisk kan dei plasserast innan slekta *Pseudomonas*.

Åttande utgåva av Bergeys Manual of Determinative Bacteriology (1) plasserar genus *Pseudomonas* i del 7. Gram-negative, aerobe stavar og kokkar. Andre karakteristika er at dei bevegar seg ved hjelp av polare flagellar, forgjærar glukose oksydativt og er katalase positive. Fleire artar produserar pigment, og mange er vanlege i jord og vatn. Dei fluorescerande pseudomonasartane er samla i ei eiga gruppe under seksjon I, og omfattar følgjande species:

Saprophytære:

1. *P. aeruginosa*
2. *P. putida*
3. *P. fluorescens*
4. *P. chlororaphis*
5. *P. aureofaciens*

Plantepatogene:

6. *P. syringae*
7. *P. cichorii*

I ein omtale av hygieniske konsekvensar av fluorescerande bakteriar, har berre dei fem førstnemnde artane interesse. Det er vidare naturleg å skilja *P. aeruginosa* ut frå dei fluorescerande saprophytære

pseudomonsartane på grunn av den viktige rolla *P. aeruginosa* spelar som *sjukdomsbakterie* for menneske og dyr. Det er også *biokjemiske skilnader* mellom *P. aeruginosa* og dei andre fluoresceinproduserande bakteriane. Særleg er det stor skilnad i optimal temperatur for vekst. *P. aeruginosa* kan veksa ved 41°C, har ein optimus temperatur på 37°C, men veks

ikkje ved 4°C. Dei andre fluorescerande pseudomonasartane veks ikkje ved 41°C og har ein optimustemperatur frå 20°C til 30°C. Dessutan er det viktig at denne gruppa kan veksa ved temperaturar ned mot 0°, og det er ofte ved så låge temperaturar dei gjer størst skade. *P. fluorescens* er oftast den dominerande arten i den psykrofile floraen.

Tabell 1. *Fluorescerande pseudomonsartar. Veksttemperatur og patogenitet.*

	Vekst ved + 41°C	Vekst ved + 4°C	Patogenitet for menneske og dyr
<i>P. aeruginosa</i>	+	÷	+
Andre florescerande pseudomonsartar	÷	+	÷

3. MEDIUM OG METODAR FOR PÅVISING AV FLUORESCERANDE BAKTERIAR I VATN

3.1. Bakgrunn.

Norsk Standard, «Metoder for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann» (21) seier at mengda av fluorescerande bakteriar skal avgjerast ved innstøyping i Kings agar B ved 20°C. King utvikla mediet i 1954 med tanke på å auke fluoresceinproduksjonen (18).

Dette oppnår ein mellom anna med alkaliske medium som er fattige på jern og rike på fosfor og magnesium. Parallelt med agar B komponerte King også agar A med tanke på best mogeleg produksjon av pyocyanin. Pyocyanin er eit anna fargestoff som er karakteristisk for *P. aeruginosa*, men som dei andre fluorescerande bakteriane ikkje har.

3.2. Dyrkingstemperatur og seleksjon.

King utprøvde media ved å stryka ut kulturane på overflata av ein skråagar inkubert ved 37°C. Ved starten av 1960-åra vart Kings agar B inkubert ved 20°C teken i bruk ved undersøking av vatn. Denne dyrkingstemperaturen selekterer dei psykrofile fluorescerande pseudomonsartane som reknast til den store gruppa jord- og vassbakteriar. Ei gransking utført av Bonde i 1963 (3) kan illustrera dette. Han isolerte fluorescerande bakteriar frå 70% av prøvene frå sjøvatn og overflatevatn, og alle koloniane vart diagnostiserte som typar innan arten *P. fluorescens*. *P. aeruginosa* vart ikkje påvist, men ved å bruka ein metode som var meir selektiv for *P. aeruginosa*, kunne også denne mikroben isolerast frå mange av dei same prøvene. Dei siste åra er det lansert ei rad nye metodar for påvising av *P. aeruginosa* fra ulike typar vatn (5, 7, 9, 12, 14, 19, 20).

Metodane byggjer anten på MPN-prinsippet, membranfiltrering eller platespreiing. Dyrkingstemperaturen varierar frå 37—43°C, og ein del metodar nyttar fluoresceinproduksjon ved identifisering.

3.3. Eigne røynslar.

Ved byveterinærlaboratoriet i Stavanger har Kings agar B vore i bruk sidan 1973 etter den metoden som seinare vart Norsk Standard. Sjølv etter så lang røynsle med mediet, er det enno ofte vanskeleg å vurdera koloniane på agaren. Dei fluorescerande overflate-koloniane kan vera sterkt mukoide og veksa med kraftige utgreiningar, slik at ein enkel koloni etter tre døger dekkjer heile skåla og hindrar teljing. Når skålene vert undersøkte i dagslys, finn ein dei gulgrøne koloniane berre på overflata endå prøvene er støypte inn i mediet. Vi har samanlikna parallell-seriar med 1 ml innstøyping og 0,1 ml spreidd på overflata, og funne 8—10 gonger fleire bakteriar pr. ml ved å så ut på overflata. D.v.s. talet på koloniar pr. skål er omlag det same ved begge metodane. Dette kan koma av at temperaturen på 45—48°C i agaren inaktiverar ein del av dei psykrofile bakteriane, eller at koloniane må ha kontakt med overflata for å gi den gulgrøne fargen i dagslys.

Ved å telja koloniane både i dagslys og UV-lys, viser det seg at ein misser ein del koloniar ved ikkje å bruka UV-lys. Dette gjeld særleg små, svakt fluorescerande koloniar inne i mediet. Når desse vert sådde ut på overflata, veks dei som karakteristiske store, gulgrøne koloniar.

Vår røynsle så langt er at innstøyping i Kings agar B bør reknast som ein *semikvantitativ metode* når det er tale om fluorescerande bakteriar.

4. FLUORESCERANDE BAKTERIAR I VATN.

Det er to hovudgrunnar til at det vert leita etter fluorescerande bakteriar i vatn:

- a. Dei er indikatorar på forureining.
- b. Dei er i seg sjølv eit hygienisk problem.

5. INDIKATORORGANISMER.

Dei fleste fluorescerande pseudomonas-artane finst vidt utbreidde i naturen, i jord, ferskt overflatevatn og i sjøvatn.

Pseudomonas aeruginosa.

Hoadley (15) og Cabelli (6) reknar tar-men hos menneske som hovedreservoar for *P. aeruginosa* sjølv om berre litt over 10% av friske vaksne menneske er berarar av bakterien.

Unge drøvtyggjarar kan også vera spreiarar av *P. aeruginosa*, men ein reknar at friske, vaksne husdyr normalt ikkje har bakterien som ein del av tarmfloraen. Cabelli tolka funn av eit fåtal *P. aeruginosa* i vatn saman med store mengder *E. coli* som forureining med avføring frå dyr.

Ut frå dette skulle *P. aeruginosa* vera ein god indikatororganisme for human fekal forureining, og fleire forfattarar har gått inn for å bruka bakterien som rutineparameter ved kontroll av vatn (15). *P. aeruginosa* høver likevel ikkje som einaste indikator på human fekal forureining. For det første er det ikkje noko konstant høve mellom denne parameteren og *E. coli* og fekale streptokokkar.

Vidare synest fordelinga *P. aeruginosa*/*E. coli* å variera sterkt med kva medium ein nyttar for påvising av *P. aeruginosa*:

Bonde (3) kom i forsøka sine fram til at ferskvatn som regel måtte ha over 1000 *E.coli* pr. 100 ml. før *P. aeruginosa* kunne påvisast, medan *Highb Smith* (14) i nyare forsøk har påvist fleire *P. aeruginosa* enn *E.coli* både i råkloakk og resipientvatn. *P. aeruginosa* overlever lengre i vatn enn *E.coli*, men formeirar seg ikkje i reint vatn. Formeiring kan skje i råkloakk og resipientvatn rikt på organisk stoff dersom det er nok oksygen og temperaturen er høg (2). Konklusjonen er at *P. aeruginosa* ikkje bør nyttast som einaste parameter for human fekal forureining. Dersom *P. aeruginosa* finst i stort antal i resipientar eller drikkevatn, tyder det på at vatnet er merkt av menneskeleg verksemd, og bakteriemengda speglar av styrken på forureininga. *P. aeruginosa* som uttrykk for helserisikoen ved å bruka vatnet, må først og fremst knytast til den rolla bakterien sjølv spelar som patogen (15).

5.2. Psykrofile fluorescerande bakteriar.

Det er ulik oppfatning av kva samband det er mellom forureining og dei andre fluorescerande pseudomonasartane. *P. fluorescens* reknast som ein naturleg del av jord- og vassfloraen. Samstundes viser forsøk at talet på psykrofile fluorescerande bakteriar aukar når *E.coli*-talet stig, utan at det er noko konstant høve mellom forureining og mengda av fluorescerande bakteriar (6). Grunnen til at psykrofile fluorescerande bakteriar ofte aukar i takt med *E.coli* i ein resipient, er at resipienten saman med *E.coli* får tilført organisk stoff og anna næring. Mykje fluorescerande kim i vatn som er fattigt på *E.coli* kan skuldast avrenning frå jordbruk (20). Thomas (24) hevda at pigmenterte bakteriar irekna dei fluorescerande berre fanst i forureina vatn, medan reint vatn var dominert av andre, mindre biokjemisk aktive Gram-negative stavbakteriar.

Tabell 2. Psykrofile *pseudomonas*bakteriar (20°C, Kings B-agar) frå ulike typar vatn.

	Talet på prøvar	Prosentvis positive	Kimtalniva pr. ml ved 20°C.
Klorert drikkevatn like etter klorering	72	0	0—50
Klorert drikkevatn periferert på leidningsnettet i Stavanger	420	12	0—300
Uklorert overflatevatn frå «Interkommunalt Vannverk», Jæren	252	36	10—500
Tilførselsbekker til Stavangers katastrofedrikkevatn (Store Stokkavatn)	47	85	1000—10 000

Tabell 2 syner eit utval av ulike typar vatn som er undersøkt ved byveterinær-laboratoriet i Stavanger. Frå bekkene og fleire av råvassprøvene har det berre vorte støypt inn 0,1 ml. Påvisningsprosen-ten er difor lågare enn om volumet heile tida hadde vore 1 ml. Sjølv om metoden vert rekna som semikvantitativ, kan det nemnast at talet på fluorescerande bakte-riar er under 10% av kimtalet ved 20°C i det uklorerte overflatevatnet, og der bakteriane har vorte påviste i klorert vatn, har talet vore lågt (1—8 pr. ml).

Råvasskjeldene for «Interkommunalt Vannverk» grensar delvis opp mot gjødsla jordbruksareal og beite for husdyr. Til-førselsbekkene til Store Stokkavatn får tilført avrenning frå dyrka mark og ein del kloakk.

6. HYGIENISKE KONSEKVEN SAR

***P. aeruginosa* som sjukdoms- bakterie for menneske og dyr**

Som før nemnt bør påvising av *P. aeru-ginosa* i vatn tolkast ut frå den rolla mikroben spelar som årsak til infeksjon og sjukdom hos menneske og dyr.

Vatn står sentralt som spreiar av *P. aeruginosa*.

6.1.a. Humanpatogen

Det er rapportert om sjukehusinfeksjo-nar der infusjonsvæsker og blod har vorte infiserte via vatnet og ført til septikemi hos pasientane. Vidare har *P. aeruginosa*-infisert vaskevatt vore årsak til infek-sjonar i brannsår og andre sår (15).

Bading og dykking i *P. aeruginosa*-for-ureina vatn kan gje infeksjonar i respira-sjonsorgana, og *P. aeruginosa* er og opphav til eksterne otittar. Denne pseudomasinfek-

sjonen er så vanleg at han på engelsk vert kalla «swimmer's ear» (6). Steaven-son (23) kom i ei undersøking fram til at halyparten av registrerte sjukdomar i samband med bading skuldast øyre- og augelidningar, ofte p.g.a. *P. aeruginosa*-in-feksjonar.

Høiby (16) har rapportert eit utbrot av ekstern otitt hos brukarar av eit inna-dørs symjebasseng der *P. aeruginosa* av same serotype vart isolert både frå in-feksjonane og i bassenget.

6.1.b. Dyrepatogen

P. aeruginosa er også opphav til sjuk-dom hos dyr. Mest kjent er det at bakte-rien er årsak til mastitt hos kyr. Kyrne kan verta smitta av infisert jur-vaskevatt, og det er også rapportert om høgare fre-kvens av pseudomonas mastitt der kyrne har vassa i infisert vatn (15). Infisert mjølk har så i sin tur gitt alvorlege tarm-infeksjonar hos spedyr. Pelsdyr kan også få *P. aeruginosa*-infeksjonar. Mellom anna har det brote ut pneumoni på mink der sterk kontaminering av drikkevatt vart rekna som smittekjelda.

P. aeruginosa har stor evne til å tilpassa seg nye miljø. Mikrobar som er isolerte frå patogene prosessar kan til dømes veksa i mange petroleumsprodukt, og dette kan skapa praktiske problem i form av produksjon av slim og slagg i olje-tankar (10).

6.2. Psykrofile fluorescerande bakteriar og kjølelagra matvarer.

P. fluorescens og dei andre psykrofile pseudomonasartane har vorte eit veksande hygienisk problem etter som bruken av å kjølelagra matvarer har auka.

Den låge temperaturen favoriserar denne floraen, som på grunn av kraftig produksjon av protolytiske og lipolytiske enzym kan øydeleggja mange produkt. *Alkaligenes*, *Acinetobacter* og *Flavobacterium* er andre genera med liknande eigenskapar som oftast vert isolerte saman med dei psykrofile pseudomonasartane.

6.2.a. Kjøtvarer.

Der kjøt vert tilverka kan bakteriane koma over på kjøtet gjennom kontakt med arbeidsbenker og reiskap som er spylte med infisert vatn. Forsøk har vist at i temperaturintervallet 2—15°C vekst pseudomonasartane fortare enn dei andre psykrofile bakteriane på overflata av kjøtet. Det synest å vera oksygentilgangen og ikkje tilgang på næring som set grensa for vekst. For dei fakultativt anaerobe bakteriane er det motsette tilfelle (11). Resultatet av ein kraftig pseudomonasvekst er pigmentert slim eller ein gelatinøs film på overflata av kjøtet saman med vond lukt og smak.

6.2.b. Mjølkeprodukt

Også moderne meieridrift har problem med psykrofile bakteriar, og dei fluorescerande artane dominerar her som i kjøtbransjen. Driftsvanskane har oppstått ved overgangen til kjølelagring av mjølk i samband med gardstanksystemet og reguleringslagring på meieria. Kvaliteten på vatnet både i gardsbrønner og dei offentlege vassverka som forsyner meieria er i høg grad med på å avgjera kvaliteten på meieriprodukta. Fluorescerande bakteriar kan oppformeira seg i vassleidningane inne i anlegget slik at vatnet i kranen inneheld fleire bakteriar enn vasskjelda som forsyner meieriet (13). Dei proteoly-

tiske og lipolytiske enzymata verkar stort sett ekstracellulært og endrar smak og utsjåande på mjølka og kortar lagringstida. Sjølv om bakteriane ikkje tåler pasteurisering, er nokre av enzymssystema varme-resistente slik at dei kan skada dei ferdige produkta under lagringa (22). Resultatet er mellom anna tidleg harskning av smør, og slim- lukt- og fargeproblem i ost. Sjølv om varmeresistente enzym ofte er årsak til skade på ferdige produkt, så skjer det også ein reinfeksjon av produkta etter pasteurisering som skuldast vatnet.

7. RESISTENS

P. aeruginosa utviklar lett resistens mot vanlege antibiotika som til dømes tetracyclin og neomycin, og til ei viss grad også mot streptomycin og chloramphenicol. Dette er ein av grunnane til at denne bakterien kan skapa alvorlege sjukehusinfeksjonar. Sjølv om mange forfattarar legg vekt på at *P. aeruginosa* kan vera resistent mot klordesinfeksjonsmiddel, vil normal klorering og pH-justering vanligvis drepa bakterien i bassengbad (13).

Det har vore vanskeleg å finna gode desinfeksjonsmiddel mot dei psykrofile fluorescerande pseudomonasartane i meieribruket. Det har vist seg at dei tradisjonelle alkaliske midla, klor og peroksyd ikkje er effektive mot desse bakteriane. Vaskemiddel som reagerar surt og desinfiserar på jodbasis har derimot vorte nytta med godt resultat (22). Røynslene frå byveterinærlaboratoriet i Stavanger tyder på at klorering av drikkevotnet fjernar dei psykrofile fluorescerande bakteriane, men frå tid til anna skjer det ei oppformering i det klorerte vatnet periferert på leidningsnettet dersom bakteriane først har kome inn i leidningane.

8. NORMER FOR FLUORESCERANDE BAKTERIAR I VATN

Dei norske kvalitetskrava set ikkje opp noko talgrense for kor mange fluorescerande kim som bør tålast i vatn til ulike bruksformål. I Norsk Standard står det at talet bør vera så lågt som råd er. *Bonde* (4) seier i sitt forslag til ei forenkla drikkevassundersøking at det er vanskeleg å fastsetje ei norm, men at det neppe kan tolererast regelmessig påvisning av meir enn «et par» fluorescerande koloniar pr. ml bruksvatn. Med den metoden som i dag vert nytta synest det heller ikkje rett å fastsetja eit eksakt talkrav, men i klorert vatn frå offentlege vassverk som også leverare vatn til meieri, slakteri og andre næringsmiddelverksemdar, bør det ikkje finnast fluorescerande bakteriar i 1 ml vatn etter metoden som i dag er Norsk Standard.

9. KONKLUSJON

1. Undersøking for fluorescerande bakteriar etter Norsk Standard 4751 er ein semikvantitativ metode.
2. Metoden får ikkje med eventuelle *P.aeruginosa* i vatnet.
3. Drikkevatt som inneheld fluorescerande bakteriar har redusert bruksverdi. Dette kan vera tilfellet sjølv om dei andre bakteriologiske resultatane er tilfredsstillande, og metoden forsvavar difor sin plass i ein drikkevassanalyse.

LITTERATURLISTE:

1. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Buchanan R. E. & N. E. Gibbons, Eds., 8th Ed., The Williams & Wilkins Company Baltimore 1974, 217—242.
2. *Bonde, G. J.*: Bacterial indications of water pollution. *Advances in Aquatic Microbiology*. Volume 1. M. R. Droop and H. W. Jannasch, Eds., Academic Press, London 1977, 273—364.
3. *Bonde, G. J.*: Bacterial indicators of water pollution. A study of quantitative estimation. 2nd Eds., Teknisk forlag, Copenhagen 1963, 287—376.
4. *Bonde, G. J.*: Forslag til forenklet procedure ved bakteriologisk drikkevassundersøging. *Dansk Vet. Tidsskrift* 1973, 56, 671—677.
5. *Brodsky, M. H. and M. C. Nixon*: Rapid metod for deteksjon of *Pseudomonas aeruginosa* on MacConkey agar under ultraviolet light. *Applied Microbiology*, 1973, 26, 219—220.
6. *Cabelli, V. J., H. Kennedy and A. Levin*: *Pseudomonas aeruginosa* — fecal coliform relationships in estuarine and fresh recreational waters. *Journal WPCF* 1976, 48, 367—376.

7. Drake, C. H.: Evaluation of culture media for the isolation and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Health Lab. Sci. 1966, 3, 10—19.
8. D. S. 265.2. Dansk Standard. En forenkle bakteriologisk drikkevandsundersøgelse 1. utg. 1974.
9. Dutka, B. J. and K. K. Kwan: Confirmation of the single-step membrane filtration procedure for estimating *Pseudomonas aeruginosa* densities in water. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 33, 240—245.
10. Edmons, P.: Selection of test organisms for use in evaluating microbial inhibitors in fuel-water systems. Applied Microbiology, 1965, 13, 823—824.
11. Gill, C. O. and K. G. Newton: The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. Applied Bacteriology 1977, 43, 189—195.
12. Grunnet, K., A. S. P. Gundstrup & G. J. Bonde: Tetrathionate broth as a medium for simultaneous demonstration of *Salmonella* and *Pseudomonas aeruginosa*. Nord. Vet. Med. 1974, 26, 239—242.
13. Harmond, L. G.: Cottage cheeses problems in produktion and sanitation. Milk and Food Technology, 1963, 26, 86—96.
14. Highsmith, A. K. and L. Abshire: Evaluating of a most-probable-number technique for the enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Microbiology, 1975, 30, 596—601.
15. Hoadley, A. W.: Potential health hazards associated with *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial Indicators/Health Hazards Associated With Water, ASTM STP 635, A. W. Hoadley and B. J. Dutka, Eds., American Society for Testing and Materials, 1977, 80—114.
16. Høiby, E. A., D. Brekke and L. Lagesen: An outbreak of external otitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* from swimming pool. Norges Idrettsforbunds sentrale rapportbank. Gruppe B.: Nr. 1003.
17. Jebsen, A.: Veterinær melkekontroll. A/S Carl Fr. Mortensen, København, 1951, 64—66.
18. King, E. O., M. K. Ward and D. A. Raney: Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. clin. Med. 1954, 44, 301—307.
19. Levin, M. A. and V. J. Cabelli: Membrane filter technique for enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Microbiology, 1972, 24, 864—870.
20. McTernan, W. F., J. C. Adams and P. A. Rechard: Comparison of methods for enumerating fluorescent bacteria. Applied Microbiology, 1974, 290—291.
21. NS 4751 Norsk Standard. Metoder for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann. 1. utg. 1976.
22. Schindler, P. H.: *Pseudomonas*, årsaker og bekjemping. Meieriposten, 1977, 66, 7—9.
23. Stevenson, A. W.: Studies of bathing water quality and health. Am. Public Health 1953, 43, 529—538.
24. Thomas, S. B. and B. F. Thomas: The bacteriology of farm water supplies: A study of the colony count in 72 hours at 22°C. Applied Bacteriology, 1955, 18, 312—321.