

# Fluorescerende bakterier i drikkevann

Av Bjørn Gondrosen og Gunnar Langeland

Bjørn Gondrosen er cand. med. vet. 1979. Kst. amanuensis ved Institutt for næringsmiddelhygiene, Norges veterinærhøgskole.

Gunnar Langeland er cand. mag. 1975 og cand. med. vet. 1976. Kommuneveterinær i Asker og Bærum.

## INNLEDNING

Bakteriologisk undersøkelse av drikkevann omfatter i Norge vanligvis koliforme bakterier (presumptive tarmbakterier), termostabile koliforme bakterier (sikre tarmbakterier) og kimtall («totalantall bakterier»). Koliforme og termostabile koliforme bakterier viser om vannprøvene kan inneholde sykdomsfremkallende tarmbakterier og tarmvirus. For brønnvann og udesinfisert overflatevann gir kimtallet indikasjon for prøvenes innhold av nedbrytbart organisk stoff. Kimtallsundersøkelser av drikkevann før og etter desinfeksjon er dessuten en god parameter for kontroll av desinfeksjonen.

Men det er én viktig egenskap ved drikkevann som ikke er dekket av disse rutinemessige bakteriologiske undersøkelsene, nemlig vannets evne til å tilføre næringsmidler, bakterier og bakterielle enzymer som fører til *bedervelse*. Slik kvalitetsforringelse av næringsmidler forårsakes hovedsakelig av arter tilhørende genus *Pseudomonas*.

*Pseudomonas*-bakterier har sitt reservoir i jord og vann. De er i 8. utgave av Bergey's Manual of Determinative Bacteriology inndelt i 29 arter (1), men det er bare 5 av disse som er av vannhygienisk interesse (2):

- *P. aeruginosa*
- *P. putida*
- *P. fluorescens*
- *P. chloroaphis*
- *P. aureofaciens*.

Alle disse bakterieartene produserer fluorescerende pigmenter, en egenskap som benyttes i diagnostikken og som har gitt opphav til begrepet «fluorescerende bakterier». Også de to plantepatogene pseudomonasartene *P. syringae* og *P. cichorii* produserer fluorescerende pigmenter (1).

Andre viktige egenskaper ved de fem førstnevnte bakterieartene (som heretter vil bli omtalt som *fluorescerende bakterier*) er at de kan produsere protelytiske og lipolytiske enzymer (1). Sammen med bakterienes egne stoffskifteprodukter vil disse enzymene kunne forårsake uønsket lukt og smak av næringsmidler som tilsiktet eller utilsiktet tilblandes drikkevann i større eller mindre mengder (2). Enzymene er relativt varmeresistente og vil derfor medføre kvalitetsforringelse og kortere holdbarhetstid av f.eks. melk, selv om *bakteriene* drepes ved pasteuriseringen. Ofte inneholder gårdsmelk betydelige mengder fluorescerende bakterier fordi vaske- og skyllevannet til melke-

anlegget har for dårlig bakteriologisk kvalitet (3).

To andre meget viktige egenskaper ved disse bakteriene er at de — i motsetning til de fleste andre bedervelsesbakterier — kan vokse helt ned til +4°C (vanlig kjøleromstemperatur) og at de er relativt resistente mot klor (1, 2).

En av de fluorescerende bakterieartene, *Pseudomonas aeruginosa*, er potensielt patogen. Den er en vanlig årsak til hud-, øregangs-, sår- og urinveisinfeksjoner hos både dyr og mennesker (4). Permanent eller temporært nedsatt motstandskraft mot infeksjoner disponerer for slike infeksjonssykdommer. Ved mangelfull klorering og/eller manglende sjokk-klorering av bassengvann vil *Pseudomonas aeruginosa* kunne representere en helseisiko for de badende (6). Bakterien forekommer i store konsentrasjoner i kloakk, og er derfor foreslått som indikatorbakterie for kloakkforurensning av drikkevannskilder (5, 6).

Den metodikk som Norsk Standard 4751 «Metoder for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann» (7) angir for analyse av fluorescerende bakterier har i praksis vist seg ikke å fungere tilfredsstillende (2, egne data). Vi har derfor foretatt litteraturgjennomgang, laboratorieforsøk og undersøkelser av et stort antall drikkevannsprøver for å finne fram til en bedre metode enn den som angis i Norsk Standard.

Flere metodikker for kvantitativ påvisning av fluorescerende bakterier i drikkevann og andre næringsmidler er beskrevet (5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16). De fleste mediene har en komplisert sammensetning og er tilsatt selektive substanser for å fremheve vekst av *Pseudomonas aeruginosa* i forhold til andre bakteriearter. Ved en kritisk gjennom-

gang av foreliggende litteratur ble vi stående igjen med bare to dyrkningsmedier som syntes aktuelle for undersøkelse av drikkevann for innhold av fluorescerende bakterier ved næringsmiddelkontroll-laboratoriene, nemlig *Kings Agar B* (7, 15) og *Henrici Agar* (16).

Det bør nevnes at den internasjonale standardiseringsorganisasjonen nylig har fremmet forslag om en røremetode, og en membranfiltermetode for analyser av *Pseudomonas aeruginosa* i vann (17).

## MATERIALE OG METODER

### Bakteriekulturer

Følgende bakteriekulturer er benyttet i laboratorieforskene med ulike bakteriemedier og dyrkningsbetingelser:

— Stamme A:

*Pseudomonas aeruginosa*  
(NVH/IMB 3576)

— Stamme B:

*Pseudomonas fluorescens*  
(NVH/IMB 3577)

— Stamme C:

*Pseudomonas fluorescens*  
(NIVA, typestamme BE 6—75)

— Stamme D:

*Pseudomonas fluorescens*  
(NIVA/IMB CYA 2/3579)

— Stamme E:

*Pseudomonas aeruginosa*  
(NVH/INMH 222)

— Stamme F:

*Pseudomonas aeruginosa*  
(NVH/INMH 600)

— Stamme G:

*Pseudomonas aeruginosa*  
(NVH/IMB 3582)

Førstelaborant *Anne-Berit Hvaal*, Institutt for mikrobiologi og immunologi, Norges veterinærhøgskole, verifiserte bakteriekulturene ved enzymserologi.

### Vannprøver

Materialet omfatter alle prøver fra den offentlige drikkevannsforsyningen i Asker og Bærum som i 1982 ble undersøkt bakteriologisk (fluorescerende kim fra 8. februar). I alt ble 685 dobbeltprøver undersøkt, herav 104 av råvann.

### Metoder

Bakteriekulturer i stasjonær vekstfase ble fortynt i steril 0,9% NaCl-oppløsning (til ca. 30 bakterier pr. ml) og sådd ut på Kings Agar B (7) og Henrici Agar (16) med 1,0% og 1,5% agarkonsentrasjon. Parallelle prøver av bakteriekulturene ble undersøkt ved innstøpnings-, overflatesprednings- og membranfilterteknikk. Ved innstøpning ble det brukt 1,0 ml bakteriesuspensjon og 20 ml medium, ved overflatesæd ble det brukt 0,1 ml bakteriesuspensjon, og ved membranfilterteknikk ble 100 ml fortynt bakteriesuspensjon og Millipore HC-filtre (0,45  $\mu$ m) benyttet. Parallelle utsæder ble dyrket aerobt ved 20°C og 30°C og avlest daglig i 7 døgn.

Vannprøvene fra Asker og Bærum ble alle undersøkt ved dyrkning på Kings Agar B ved 20°C i 3 døgn. Avhengig av forventet bakteriekonsentrasjon ble prøvene undersøkt ved overflatesprednings- og/eller membranfilterteknikk.

Antall fluorescerende kolonier på bakterieskålene ble avlest i UV-lys med bølgelengde ca. 366 nm.

## RESULTATER OG DISKUSJON

### Utprøving av metodikker

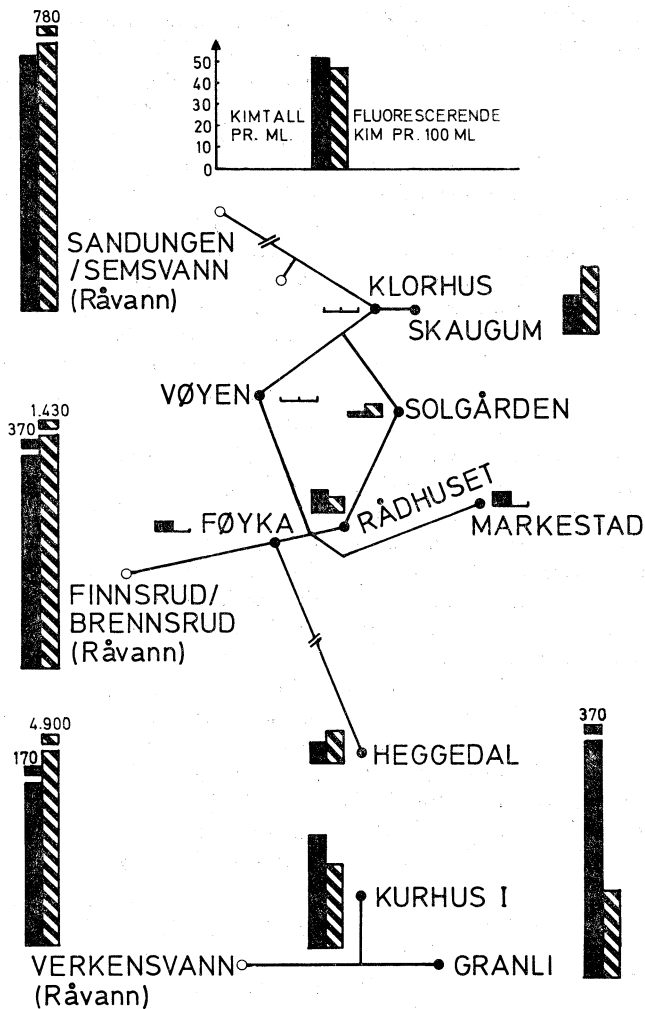
Ved parallelle undersøkelser av bakteriekulturene i Kings Agar B og Henrici Agar ved innstøpnings-, platesprednings- og membranfilterteknikk, ble det funnet at platesprednings- og membranfilterteknikk var innstøpningsteknikken overlegen. (Norsk Standard angir *innstøpning* i Kings Agar B). På både Kings Agar B og Henrici Agar var fluorescensen rundt kolonier under agaroverflaten svakere enn for overflatekolonier. Et annet problem var at ved innstøpningsteknikk dekket store kolonier på overflaten mindre underliggende kolonier inne i bakteriemediet.

Ytterligere argumenter til fordel for overflatesprednings- og membranfilterteknikk er at *Pseudomonas*-bakterier vil kunne inaktiveres ved de temperaturer de utsettes for ved innstøpning i varmt flytende bakteriemedium og at ved membranfilterteknikk kan store prøvemengder undersøkes (2).

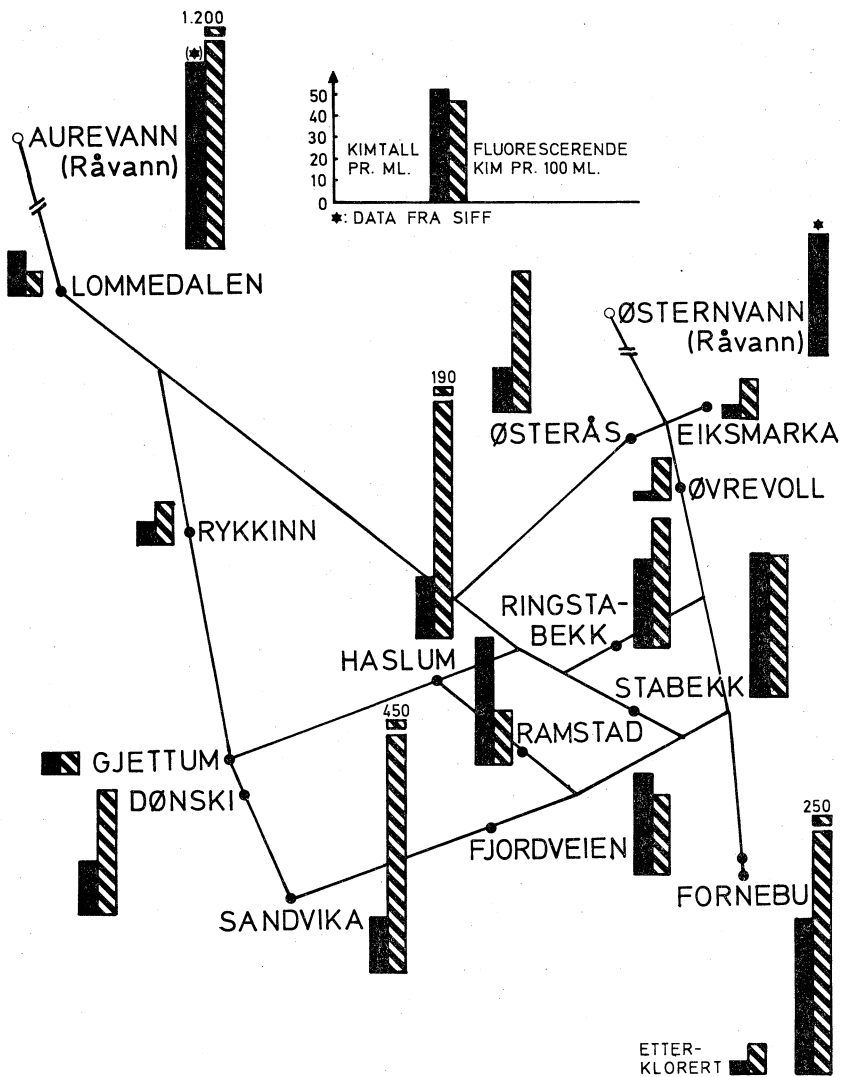
På Henrici Agar ga enkelte stammer av bakteriekulturene små kolonier med såpass liten fluorescens at resultatene ble lavere enn på parallelle skåler med Kings Agar B. Henrici Agar hadde dessuten den egenskap at fluorescensen tapte seg etter 4—5 døgn dyrkning.

*Pseudomonas aeruginosa* vokser bedre ved 30°C enn ved 20°C, mens det motsatte er tilfelle for de øvrige 4 arter vi har definert i gruppen fluorescerende bakterier. Erfaringene fra forsøkene var likevel at antall avlesbare kolonier ikke økte ved dyrkning utover 3 døgn, og at dyrkning ved 20°C ga høyere antall avlesbare kolonier enn dyrkning ved 30°C.

Agarkonsentrasjonen i bakteriemediene hadde ingen betydning for resultatene.



Figur 1. Kimtall og fluorescerende kim i det offentlige drikkevannet i Asker. Aritmetiske middelværdier for 1982.



Figur 2. Kimtall og fluorescerende kim i det offentlige drikkevannet i Bærum. Aritmetiske middelværdier for 1982.

## Undersøkelser av vannprøver fra Asker og Bærum

Både Asker og Bærum har meget høye konsentrasjoner av kimtall og fluorescerende kim i sine råvannskilder. Særlig gjelder dette to av Askers råvannskilder (Finnsrud/Brendsrud og Verkensvann) som er påvirket fra jordbruksaktivitet. For råvann fra Bærum er datagrunnlaget forholdsvis lite.

Som det fremgår av figur 1 og 2, gir kloreringen en dramatisk reduksjon av drikkevannets innhold av fluorescerende kim og kimtall, men i Bærum øker konsentrasjonen igjen utover nettet.

Som en generell regel i Bærum gjelder det forhold at jo lenger unna vannverket en prøve er tatt — jo høyere er konsentrasjonene av fluorescerende kim og kimtall. For å redusere råvannets fargetall oksyderes råvann fra Aurevann i Bærum med ozon (O<sub>3</sub>). Antakelig er en viktig delårsak til oppveksten av fluorescerende kim og kimtall utover i Bærum kommunes drikkevannsnett ozonets spaltning av tungt nedbrytbart organisk stoff til forbindelser som er mer velegnet som næringsstoffer for disse bakteriene (18).

For å gi en tilfredsstillende bakteriologisk kvalitet av drikkevannet til flyene på Fornebu, blir dette vannet etterklorert i en egen enhet. Effekten fremgår nederst til høyre i figur 2.

I Asker skjer det ikke en tilsvarende oppvekst på ledningsnettet som i Bærum. I en periode sviktet desinfeksjonen for drikkevannet til Skaugum, noe som ga et vesentlig bidrag til de høye middelverdiene for dette prøvetaksstedet.

Det var høye konsentrasjoner av kimtall og fluorescerende kim i desinfisert drikkevann fra Verkensvann som forsyner Dikemark sykehus. Dette vannforsyningsanlegget (som eies og drives av

Oslo kommune) tilfredsstillende ikke dagens krav m.h.t. driftssikkerhet og vannbehandling.

En kunne kanskje vente å finne høyere bakteriekonsentrasjoner i vannprøver fra sommerhalvåret. Slike variasjoner (som funksjon av måned) var ikke signifikante, hverken for kimtall eller fluorescerende kim, i hverken råvann eller desinfisert vann.

Det var heller ikke signifikante samvariasjoner mellom konsentrasjonene av kimtall og konsentrasjonene av fluorescerende kim, hverken for råvann eller for desinfisert vann i noen av kommunene.

Ujevn og svak fluorescens, og store utflytende kolonier var enkelte ganger problemer ved avlesning av bakterieskålene med prøver fra Asker og Bærum. Av og til var det betydelige variasjoner mellom resultatene fra parallelt uttatte prøver.

Både Asker og Bærum har et betydelig antall næringsmiddelbedrifter. Overvåking av drikkevannets innhold av kimtall og fluorescerende kim er derfor en viktig oppgave for den kommunale næringsmiddelkontrollen.

## KONKLUSJON

Fluorescerende bakterier i drikkevann er et viktig bruksmessig og hygienisk parameter. Den metode som angis i Norsk Standard for bakteriologiske undersøkelser av drikkevann, er ikke velegnet for analyser m.h.p. fluorescerende bakterier. Det anbefales å anvende overflatedyrkning ved 20°C i 3 døgn på bakteriemediet Kings Agar B. Ved membranfilterteknikk kan store prøvemengder undersøkes — og dermed lave konsentrasjoner påvises. Høye konsentrasjoner av fluorescerende kim er påvist i det offentlige drikkevannet i Asker og Bærum.

## LITTERATURLISTE

1. Doudoroff, M. & Palleroni, N. J. (1974): *Pseudomonas*. I R. E. Buchanan & N. E. Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 8. utg., s. 217—243.
2. Staveland, K. (1979): Undersøkning for fluorescerande bakteriar i vatn og hygienisk betydning av dette. Vann — 1 B, s. 95—102.
3. Schindler, P. H. (1977): *Pseudomonas*, årsaker og bekjemping. Meieriposten nr. 1, s. 7—9.
4. Hoadley, A. W. (1977): 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, s. 80—114.
5. American Public Health Association, American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, Eds. (1976): Standard methods for the examination of water and wastewater. 14th ed. Washington.
6. Cabelli, V. J., Kennedy, H. and Levin, A. (1976): *Pseudomonas aeruginosa* — fecal coliforme relationships in estuarine and fresh recreational waters. Journal WPCF, 48, s. 367—376.
7. Norges Standardiseringsforbund (NSF) (1976): Norsk Standard NS 4751. Vannundersøkelse — metoder for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann, 1. utg.
8. Brown, V. I. and Lowbury, E. J. L. (1965): Use of an improved centrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. J. clin. Path. 18, 752—756.
9. Brodsky, M. H. and Nixon, M. C. (1973): Rapid Method for Detection of *Pseudomonas aeruginosa* on MacConkey Agar Under Ultraviolet Light. Applied Microbiology, 26, s. 219—220.
10. Highsmith, A. K. and Abshire, R. L. (1975): Evaluation of a Most-Probable-Number Technique for the Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Microbiology, 30, s. 596—601.
11. Grunnet, K., Grudstrup, A. S. P. og Bonde, G. J. (1974): Tetrathionate Broth as Medium for Simultaneous Demonstration of *Salmonella* and *Pseudomonas aeruginosa*. Nordisk Veterinær Medicin, 26, s. 239—242.
12. Levin, M. A. and Cabelli, V. J. (1972): Membrane Filter Technique for Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Microbiology, 24, s. 864—870.
13. Drake, C. H. (1966): Evaluation of culture media for the isolation and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Health Laboratory Science, 3, 1, s. 10—19.
14. Dutka, B. J. and Kwan, K. K. (1977): Confirmation of the Single-Step Membrane Filtration Procedure for Estimating *Pseudomonas aeruginosa* Densities in Water. Applied and Environmental Microbiology, 33, s. 240—245.
15. King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. clin. Med., 44, s. 301—307.
16. McTernan, W. F., Adams, J. C. and Rechar, P. A. (1974): Comparison of Methods for Enumerating Fluorescent Bacteria. Applied Microbiology, s. 290—291.
17. International Organization for Standardization/Association Francaise de Normalisation (1983): The isolation and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from water by the multiple tube technique. The isolation and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from water by the membrane filtration technique.
18. Bærum kommune (1979): Kimtallsundersøkelse Aurevann høsten 1978.