

Hurtigmetode for kontroll av mikrobiell forurensning

Av Liv Fiksdal og James D. Berg.

Liv Fiksdal er 1. amanuensis ved Institutt for vassbygging, NTH.

James D. Berg var gjesteforsker ved Institutt for vassbygging i perioden 1985—86 og er nå ansatt i Aquateam A/S.

Innlegg ved Liv Fiksdal på fagtreff i Norsk vannforening 26. mars 1990

Sammendrag

Det er utviklet en hurtigmetode for å bestemme mikrobiell vannkvalitet. Metoden er basert på måling av aktiviteten til en type enzymer som finnes i bakteriene, såkalte ekstracellulære hydrolaser. Analysetiden er ca. 20 minutter. Metoden er benyttet for å bestemme innhold av tarmbakterier (termotolerante koliforme bakterier) og «totalt» antall bakterier (heterotroft kimtall) i vann. Det tas sikte på å utvikle et system hvor metoden benyttes for kontinuerlig overvåking av vannkvalitet.

Innledning

Vannkvalitets-undersøkelser omfatter ulike metoder, som kan beskrives som fysiske, kjemiske og mikrobiologiske målemetoder. I mange sammenhenger er det viktig å kunne få raske svar på vannanalysen, noe som har resultert i utvikling av sensorer for bestemmelse av for eksempel pH, temperatur og ulike ioner. Det har lenge vært arbeidet med utvikling av teknik-

ker for rask bestemmelse av mikrobiell vannkvalitet. Behovet for slike metoder er knyttet til ulike områder, noen eksempler er vist i tabell 1.

Idag finnes det en del hurtigmetoder hvor analysetiden varierer fra noen minutter til noen timer, men hvor utstyrskostnader og sensitivitet varierer mye for de ulike metodene. Det ligger fortsatt en utfordring i det å utvikle metoder som både er raske, rimelige å gjennomføre og som kan registrere lave nivå av bakterier. I forbindelse med overvåking av drikkevann er det for eksempel ønskelig å kunne registrere konsentrasjoner ned til 1 termotolerant koliform bakterie pr. 100 ml vannprøve.

En ytterligere utfordring ligger det i å utvikle metoder for bakterieanalyse som både er raske og kontinuerlige. Ved institutt for vassbygging, NTH, har en arbeidet med å utvikle en slik metode. Analysetiden er ca. 20 min. og metoden er hittil benyttet for å bestemme tarmbakterier (termotolerante koliforme bakterier) og «totalt» antall bakterier (heterotroft kimtall) i vann og i biofilm. Metoden er foreløpig ikke utprøvd i forbindelse med kontinuerlig analyse.

Tabell 1. *Anvendelses-områder for mikrobielle hurtigmetoder.*

Område	Problem
Drikkevanns-overvåking	Hygiene, korrosjon, lukt og smak.
Fiske-oppdrett	Hygiene, produktkvalitet
Næringsmiddel- og farmasøytisk industri	Hygiene, produktkvalitet
Olje-produksjon	Mikrobiell korrosjon, «souring» i oljereservoarer

Prinsipp for metoden

Bakterier inneholder enzymer som har ulike funksjoner. En gruppe enzymer, hydrolaser, har som oppgave å spalte store molekyler til mindre enheter. I den aktuelle metoden måler en ekstracellulær hydrolaseaktivitet ved å sette metyllumbelliferyl(MU)-forbindelser, for eksempel MU-heptanoat, til vannprøven. Det finnes imidlertid en rekke stoffer som kan benyttes som substrat for å måle hydrolase-aktivitet (6).

Noen kan bare spaltes av bestemte bakterier, 4-MU-B-D-galactosid vil for eksempel spaltes ved 41°C av *Escherichia coli*, mens andre som for eksempel MU-heptanoat(MUH), vil spaltes av ulike typer bakterier. MUH kan derfor

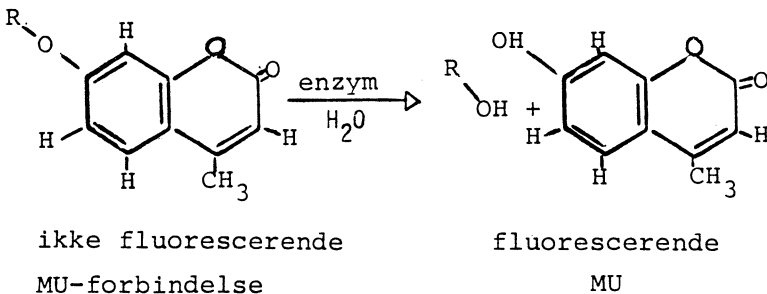
benyttes når en skal analysere på «totalt» innhold av bakterier.

I det spaltingen skjer, dannes det fluorescerende produktet methylumbelliferyl (MU) (Fig. 1).

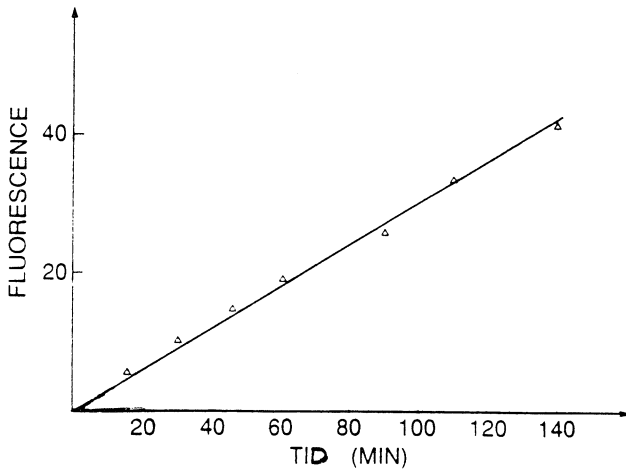
Analysen er basert på at vannprøvens fluorescens(F) måles ved gitte tidsintervall i et bestemt tidsrom, f.eks. hvert 5 minutt i 20 min., og hellningen på kurven angir vannprøvens hydrolyseaktivitet (Fig. 2). Dersom fluorescensen standardiseres mot konsentrasjonen av MU, kan aktiviteten oppgis f.eks. som $\mu\text{mol MU}$ produsert pr. liter og minutt.

Anvendelse av metoden

MU-forbind er anvendt i kliniske, enzymatiske undersøkelser (3, 5, 7), i



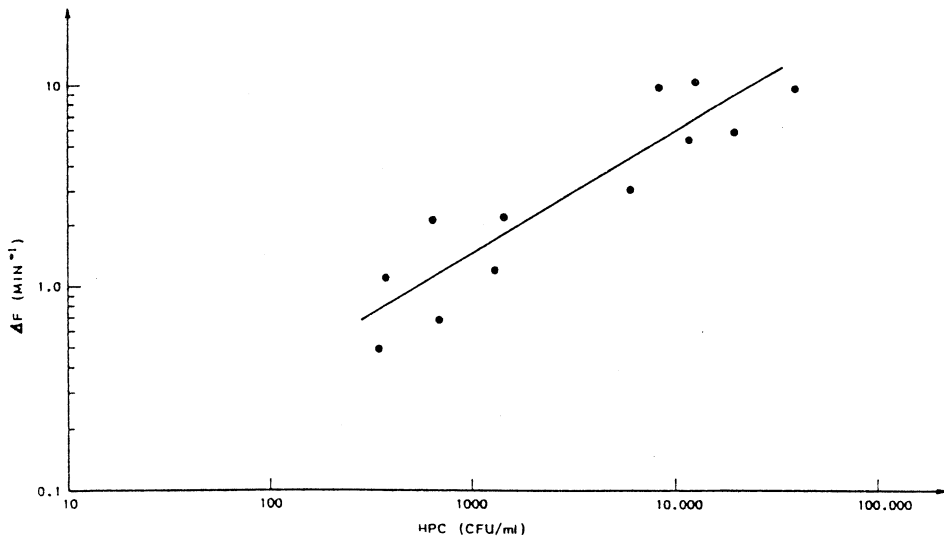
Figur 1. *Enzymatisk spalting av methylumbelliferyl-forbindelser (R står for ulike grupper).*



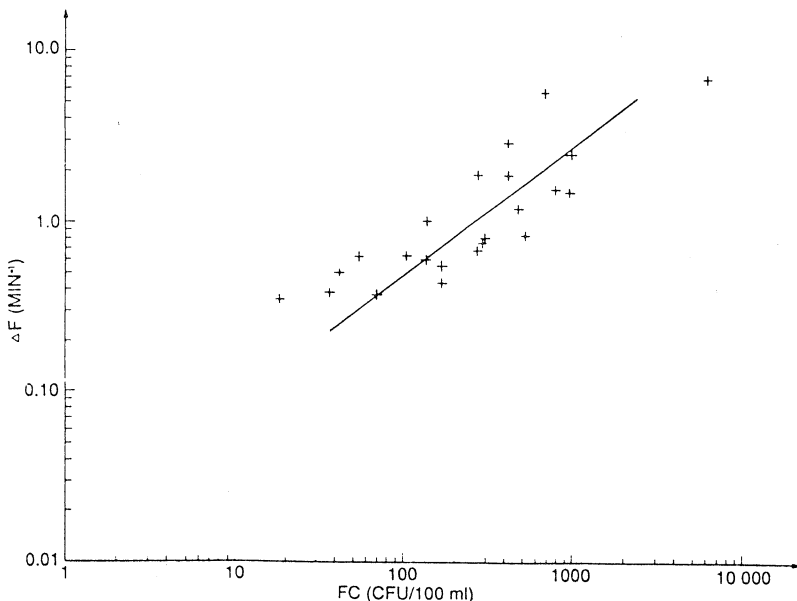
Figur 2. Måling av enzymaktivitet i forurenset drikkevann.

undersøkelser av næringsstoffomsetning i kystfarvann (4) og for analyse av tarmbakterie-innhold i vann (1, 2) og heterotroft kimtall. I noen sammenhenger ønsker en å bestemme kimtall

som ledd i forurensningsovervåkingen. Ved å analysere vann med forskjellig kimtall, har en kunnet vise en god korrelasjon mellom kimtall og hydrolyseaktivitet (fig. 3).



Figur 3. Sammenheng mellom heterotroft kimtall(HPC) og MUHase-aktivitet (ΔF).



Figur 4. Sammenheng mellom innhold av termotolerante koliforme bakterier(FC) og 4-MU-B-D-galactosidase-aktivitet (ΔF).

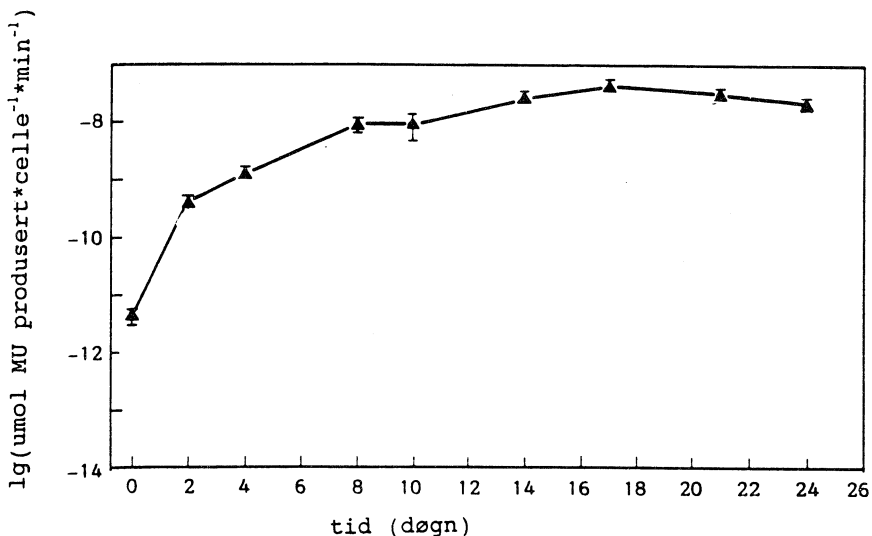
Tarmbakterie-innholdet i vann som er forurenset med kommunalt avløpsvann er også undersøkt (fig. 4).

Hydrolase-innholdet gir et mål for hvor aktive bakteriene er. Dersom innholdet pr. bakterie er konstant, vil det være en lineær sammenheng mellom målt aktivitet og antall bakterier i vannet (fig. 4). Innholdet av de aktuelle enzymene vil imidlertid kunne variere noe avhengig av vannkvaliteten. Dersom vannet inneholder lite næringsstoff som bakeriene kan ta opp direkte (aminosyrer, monomere sukkerforbindelser etc.), kan bakteriene produsere hydrolaser som bryter ned eventuelle store, organiske molekyler i vannet til mindre enheter. I fig. 5 er det vist hvordan MUHase-innholdet øker med tiden i *E.coli* som er overført fra et

næringsrikt vekstmedium til naturlig sjøvann. I drikkevann vil variasjonene i vannkvalitet være vesentlig mindre enn de som ble benyttet i eksemplet over. For å kunne relatere hydrolase-aktivitet til antall celler er det likevel viktig å ha etablert korrelasjonskurver mellom celletall og aktivitet som gjelder for den vannmassen en skal undersøke.

Metodens sensitivitet

Slik metoden utføres i dag har en hitil kunnet bestemme konsentrasjoner av termotolerante koliforme bakterier ned til ca. 100 bakterier/100 ml (1). Metoden omfatter et filtreringstrinn slik at bakterie-innholdet under selve analysen er oppkonsentrert 25 ganger. I en kontinuerlig analyse er det mest

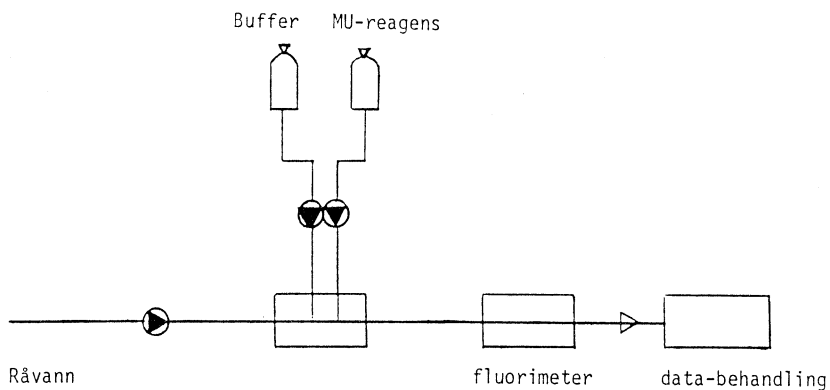


Figur 5. Endring av MUHase-aktivitet i *E. Coli* etter overføring fra næringsrikt vekst-medium til naturlig sjøvann.

praktisk å utelate filtreringstrinnet. I såfall vil sensitiviteten som hittil er oppnådd tilsvare 2500 termotolerante kolidorme/100 ml. Ved å arbeide videre med analyse-betingelsene forventer en å kunne forbedre metodens sensitivitet.

Videre utvikling

For kontinuerlig overvåking av vannkvalitet tar en sikte på å bygge opp et system slik det er vist skjematisk i fig. 6.



Figur 6. Skjematisk fremstilling av system for hurtig, kontinuerlig analyse av bakterieinnhold i vann.

Vi vet at metoden fungerer for hurtig bestemmelse av heterotroft kimtall og for termotolerante koliforme bakterier i vann. Dersom en vil bruke metoden for å overvåke forurensing av f.eks. drikkevann, vil den sensitivitet som foreløpig er oppnådd kunne være tilstrekkelig.

Dersom metoden skal brukes for

overvåking av drikkevanns-kvalitet og kravet er at en skal analysere ned til 1 termotolerant koliform bakterie/100 ml, må sensitiviteten forbedres.

Metoden har et potensiale med hensyn på detektering av andre bakterietyper enn dem en hittil har undersøkt.

LITTERATUR

1. Berg, J. D. og Fiksdal, L., 1988: Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone-B-D-galactoside. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 2118—2122.
2. Fiksdal, L., M. Pommepuy, A. Derrien og M. Cormier, 1989: Production of 4-methylumbelliferyl heptanoate hydrolase by *Escherichia coli* exposed to seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 2424—2427.
3. Godsey, J. H., M. R. Matteo, D. Shen, G. Tolman og J. R. Gohlke, 1981: Rapid identification of *Enterobacteriaceae* with microbial enzyme activity profiles. *J. Clin. Microbiol.* 13, 483—490.
4. Hoppe, H-G., 1983: Significance of exoenzymatic activities in the ecology og brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 11, 299—308.
5. Maddocks, J. L. og M. J. Greenan, 1975: A rapid method for identifying bacterial enzymes. *J. Clin. Pathol.* 28, 686—687.
6. Snyder, A. P., T. T. Wang og D. B. Greenberg, 1986: Pattern recognition of in vivo enzyme-substrate fluorescence velocities in microorganism detection and identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 969—977.
7. Trepeta, R. W. og S. C. Edberg, 1984: Methylumbelliferyl-B-D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 19, 172—174.