

Nye metoder for bakteriologisk kontroll av drikkevann

Av Liv Fiksdal.

Liv Fiksdal er førsteamanuensis og dr.ing. ved NTH.

Innlegg på møte i Norsk Vannforening 22. mars 1993.

I forbindelse med bakteriologisk kontroll av drikkevann ønsker en å bestemme antallet av bestemte bakterier i vannet. Ved rutinemessig overvåking er det som regel innholdet av såkalte indikatorbakterier som undersøkes. Det er to problemstillinger jeg vil peke på i den sammenhengen.

Den ene er at såkalte stressede bakterier ikke alltid lar seg dyrke opp som kolonier på agarplater (culturable) selv om bakteriene er metabolsk aktive (viable). Dette gjelder for eksempel species av *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Legionella* og *Campylobacter* (referert i (1)). Stressede bakterier vil kunne forekomme for eksempel i forbindelse med at vann desinfiseres eller når bakterien slippes ut i sjøen i form av rensset eller urensset kommunalt avløpsvann.

Den andre problemstillingen er at de metodene som rutinemessig benyttes i dag tar 24—28 timer. Dette kan være lang tid i en situasjon hvor det må avklares om en vannkilde er forurenset.

I forbindelse med overvåking av vannkvalitet er det i standardmetoder

foreslått at analyse av stressede indikatorbakterier kan skje ved å bruke spesielle medier (2) eller to trinns inkubering, først 4 timer ved 30°—37°C og deretter 20 timer ved 44,5°C (2, 3). Kogure et al (4) publiserte i 1979 en metode hvor nalidixic acid ble tilsatt bakterier på et filter slik at cellene vokste, men uten å dele seg. Ved å telle antall unormalt store celler kan en få et mål for antall «viable» celler i prøven (direct viable count, DVC). Teknikken har vært benyttet i flere undersøkelser av renkulturer (av en enkelt bakterietype), men er ikke så lett å bruke på blandings-kulturer slik vi har i naturlige vannmasser.

Det kan være store forskjeller mellom totalt antall bakterier (acidific orange direct count, AODC) og «viable» bakterier (DVC) på den ene siden, og dyrkbare celler på den andre. Dette ble demonstrert i en amerikansk undersøkelse hvor ulike bakterier som opprinnelig var isolert fra drikkevann, ble eksponert i sterilt drikkevann i 10 dager, ved 25°C (1). Bakterieinnholdet ble analysert som AODC, DVC og dyrkbare bakterier (på henholdsvis MacConkey og Tryptic Soya agar).

Klebsiella pneumoniae var ikke dyrkbar etter 4 døgn, mens både DVC og

AODC antallet fortsatt var like høyt etter 7 døgn. Tilsvarende var antall dyrkbare celler av *Enterobacter aerogenes* lavt (MacConkey) eller 0 (tryptic soya) etter 4 døgn, mens totalt antall bakterier og antall «viable» fortsatt var høyt etter 10 døgn.

Etter min oppfatning har vi hverken nye eller fullgode metoder for overvåking og analyse av totalt antall metabolsk aktive (viable) celler av aktuelle bakterier i drikkevann.

For det andre området jeg har pekt på, hurtige metoder, skal jeg nevne to grupper av teknikker som begge har vært omfattet av stor interesse de seinere åra.

Den ene er bruk av såkalte gen probes i kombinasjon med polymerase kjedereaksjon (PCR), den andre er måling av aktivitet for enzymer som er karakteristiske for aktuelle bakterier.

Gen - probes

Når nukleinsyre(DNA)-mønsteret i et gen er kjent hos en aktuell bakterie, kan dette utnyttes til å fremstille såkalte gen-probes for dette genet. Ved å bestemme mengden av et aktuelt gen (target) i en vannprøve, kan en således indirekte bestemme antallet av bakterien som inneholder genet, når mengde gen pr. bakterie er kjent.

Bruken av gen probes og PCR kan for eksempel foregå som følger: Gen-probe DNA eller target-DNA merkes, f.eks. med et radioaktivt molekyl eller et fluorescerende enzymsubstrat som er lett å kvantifisere. Derksom den aktuelle bakterien finnes i prøven, mangfoldiggjøres target-DNA fra denne. Innholdet av den aktuelle gendelen i den ukjente prøven kan så finnes ved å bestemme mengden av probe-target sammenbindinger.

For at metoden skal være kvantitativ må genmaterialet som mangfoldiggjøres være av god kvalitet, hvis ikke, kan det føre til store kvantitative feil. Også andre faktorer kan innvirke på graden av kvantitet som oppnås.

Da genprobe teknikken ble utviklet, var det umulig å fremskaffe nok av aktuelt target-DNA til at mange hybridiseringsreaksjoner kunne gjennomføres. Nå gjøres dette raskt og relativt enkelt ved bruk av PCR-teknikken (polymerase chain reaction). Analysen kan i dag gjennomføres i løpet av 5–6 timer. Forskergrupper undersøker bruken av den i ulike sammenhenger (medisinsk diagnostikk, kontroll av næringsmidler, vannanalyse).

I undersøkelser av renkulturer av *E. coli* er det vist at deteksjonsgrensen ved bruk av ³²P-merkede gen probes var 1 bakterie/100 ml vannprøve (5). For å teste anvendbarheten av PCR-gen probe teknikken for koliforme bakterier og *E. coli*, ble vannprøver fra Ohio river og vannledningsnettet i Louisville undersøkt. I undersøkelsen benyttet en to genområder som finnes i henholdsvis koliforme bakterier og i *E. coli* sp. Innholdet av dyrkbare koliforme bakterier og *E. coli* ble også bestemt. Undersøkelsen viste at mhp resultater var gen probe/PCR-teknikken statistisk ekvivalent med de andre metodene som ble benyttet (5).

For analyse av *Legionella* bakterier i vann tilbys nå på markedet et såkalt kit basert på bruk av gen probe og PCR. Analysen gjennomføres i løpet av 5 timer.

Det arbeides med å avklare hvordan gen probe/PCR-teknikken kan brukes i forhold til deteksjon av henholdsvis døde, dyrkbare og metabolsk aktive bakterier.

Enzymatiske metoder

Blant disse skal jeg se på metoder som er utviklet for analyse av totalt antall koliforme bakterier og *E. coli*. I en forurenset vannprøve utgjør vanligvis *E. coli* hovedmengden av termotolerante koliforme bakterier (også kalt fekale koliforme bakterier).

På det amerikanske markedet tilbys nå to kommersielt tilgjengelige kits: Coliquick (CQ) og Colilert (CL) som begge utfører samtidig bestemmelse av koliforme bakterier og *E. Coli*, enten som most probable number eller som presence- absence analyse. Vannprøven tilsettes i prøverør sammen med næringsstoff og enzymsubstrat og prøven lagres i 24 timer ved 35°C. Gul-farging av prøvene betyr nærvær av koliforme bakterier. Dersom prøvene fluorescerer når de blir belyst med en UV-lampe, tolkes det som nærvær av *E. coli*.

I en amerikansk undersøkelse har en sammenlignet resultater oppnådd ved bruk av CQ og CL med bestemmelse av koliforme og fekale bakterier vha membranfilter-teknikk (7, 8). Det var god overensstemmelse mellom de tre teknikkene mhp bestemmelse av koliforme bakterier i behandlet og ubehandlet overflatevann. Det samme gjaldt bestemmelse av *E. coli* i ubehandlet overflatevann. For behandlet (brekkpunktlorering, koagulering, sedimentering, filtrering, etterklorering med kloraminer) overflatevann ga både CQ og CL lavere tall for *E. coli* enn rutinemetoden, og CL ga lavere tall enn CQ. Forskjellene skyldtes falske nega-

tive resultater i CQ og CL testene. Det ble konkludert med at spesielt CL kanskje var mindre egnet for analyse av stressede *E. coli* bakterier.

Kanadiske forskere som også har sammenlignet CQ og CL kom til et noe annet resultat. De undersøkte prøver fra ellevann og fant at CL og rutinetesten (membranfiltermetode) mhp koliforme bakterier ga likeverdig resultat, mens CQ ga signifikant lavere verdier. CQ ga også signifikant lavere resultat mhp *E. coli* enn rutinemetoden ved analyse av fekale koliforme bakterier i ellevann, mens CL i noen analyseserier ga lavere bakterietall og i andre likeverdig resultat sammenlignet med membranfiltermetoden (9). I den kandiske undersøkelsen ble ulikheter i kjemikalieblandingene gitt som mulig forklaring på forskjellene mellom deres resultater og resultatene fra den amerikanske undersøkelsen.

Både CQ og CL markedsføres som 24-timers tester. I Norge er det nå utviklet hurtigteknikker. Analysen utføres ved 44,5°C og analysetiden varierer fra 15 minutt til 7 timer, avhengig av hvilken nedre deteksjonsgrense som kreves. Med 7-timers teknikken kan ned til 1 termotolerant koliform bakterie/100 ml prøve bestemmes. Teknikken er utviklet i et samarbeide mellom Institutt for vassbygging, NTH, og Aquateam as. Et kit for 7-timers metoden er under utprøving i forbindelse med kommersialisering av produktet (Colifast) og 15 minteknikken benyttes i forbindelse med utvikling av instrumenter for kontinuerlig analyse av vannprøver.

Litteratur

- (1) Byrd, J.J., Xu, H-S. og Colwell, R.R. (1991): Viable but non-culturable bacteria in drinking water.

- (2) American Public Health Association (1989): Standard methods for the examination of water and wastewater, 17. ed. American Public Health Association, Washington D.C.
- (3) Norsk Standard NS 4792: Vannundersøkelse. Termotolerante coliforme bakterier og presumptiv *E. coli*. Membranfiltermetode. 1990.
- (4) Kogure, K., Simidu, U. og Taga, N. (1979): A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25** 415—420.
- (5) Bej, A., McCarty, S.C. og Atlas, R.M. (1991): Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by Multiplex polymerase chain reaction : Comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** 2429—2431.
- (6) Manafi, M., Kneifel, W. og Bascomb, S. (1991): Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol. Rev.* **55** 335—348.
- (7) Clark, D.L., Milner, B.B., Stewart, M.H., Wolfe, R.L. og Olson, B.H. (1991): Comparative study of commercial 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide preparations with the standard methods membrane filtration fecal coliform test for the detection of *Escherichia coli* in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** 1528—1534.
- (8) Olson, B.H., Clark, D.L., Milner, B.B., Stewart, M.H. og Wolfe, R.L. (1991): Total coliform detection on drinking water: Comparison of membrane filtration with Colilert and Coliquick. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** 1535—1539.
- (9) Clark, J.A. og El-Shaarawi, H. (1993): Evaluation of commercial presence-absence test kits for detection of total coliforms, *Escherichia coli* and other indicator organism. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** 380—388.