

# Ny drikkevannsforskrift - nye mikrobiologiske parametere og referansemetoder

Av Øyvind Østensvik

Øyvind Østensvik er førsteamanuensis ved Norges veterinærhøgskole.

Innlegg på seminar i Norsk vannforening 12. desember 2001

## Innledning

En ny norsk drikkevannsforskrift trådte i kraft 1. januar 2002. Forskriften er bygd på EU-direktiv 98/83/EF. Som tillegg til forskriften er det angitt mikrobiologiske parametere og analysemetoder. I den gamle drikkevannsforskriften fra 1995 var det angitt ulike prinsipper for de mikrobiologiske analysemetodene. Den nye forskriften angir spesifikke referansemetoder som skal benyttes ved mikrobiologisk analyse av drikkevann. I denne artikkelen gis det en oversikt over de mikrobiologiske parametere i drikkevannsforskriften og hvilken informasjon mikrobiologiske analyser kan gi. I tillegg gis det en kort omtale av hovedprinsippene i de enkelte analysemetodene.

## Mikrobiologiske parametere

Hovedhensikten med mikrobiologiske analyser av drikkevann er å sikre at vannet er hygienisk betryggende, det vil si at det ikke skal inneholde smittestoff i konsentrasjoner som kan føre til sjukdom.

De mikrobiologiske parametere som inngår i den nye drikkevannsforskriften er gjengitt i Tabell 1. Mikroorganismer som påvises ved tradisjonelle dyrkingsmetoder utgjør bare en liten del av vannets totale innhold av mikroorganismer. Ved dyrking kan det påvises mikroorganismer som stammer fra to hovedreservoar; jord- og vannreservoaret (normalflora) og det animal-humane reservoaret (forurensingsflora). Kimtallsanalysen ved 22°C gir i hovedsak et mål for vannets innhold av normalflora. De andre mikrobiologiske parametere i drikkevannsforskriften er rettet mot mikrobiell forurensing av vannet.

Sammenlignet med drikkevannsforskriften fra 1995 har *Escherichia coli* erstattet termotolerante koliforme bakterier (TKB). *E. coli* er den viktigste bakterien i gruppen TKB, og kan utgjøre om lag 80-90% av TKB. *E. coli* er mer feces-spesifikk enn TKB, og endringen vil gjøre den hygieniske vurderingen av drikkevann sikrere. *Clostridium perfringens* har erstattet sulfittreduserende klostridier (SRK). *C. perfringens* påvises regelmessig i

feces fra dyr og mennesker og kan utgjøre i størrelsesorden 75% av gruppen SRK. Klostridier er sporedannende bakterier, og sporene kan overleve svært lenge i naturen. Relevansen som fekal indikator kan derfor være usikker. Den nye forskriften inneholder også mikrobiologiske kvalitetskrav til vann på flaske. I tillegg til de para-

metrene som gjelder for drikkevann skal flaskevann undersøkes for innhold av *Pseudomonas aeruginosa*. *Ps. aeruginosa* er en bakterie som kan finnes på huden hos mennesker. Forekomst i flaskevann kan indikere dårlig produksjonshygiene eller at grunnvann er forurenset med overflatevann.

Parameter	Referansemetode	Alternativ metode
Kimtall 22°C og 36°C	NS-EN ISO 6222	
Koliforme bakterier og <i>Escherichia coli</i>	NS-EN ISO 9308-1	Colilert-18/Quantitray
Koliforme bakterier	NS 4788	
Termotolerante koliforme bakterier og presumptiv <i>E. coli</i>	NS 4792	
Intestinale enterokokker	NS-EN ISO 7899-2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	prEN 12780	
<i>Clostridium perfringens</i>	mCP-agar	NS-ISO 6461-2 med verifisering

Tabell 1. Mikrobiologiske parametere, referansemetoder og alternative metoder angitt i den nye drikkevannsforskriften.

**Kimtall.** Kimtallsanalyser gir et kvantitativt bilde av antall dyrkbare mikroorganismer i vann. Det er viktig å understreke at kimtall ikke er det samme som det totale antallet mikroorganismer i vannet. Kimtallet beskriver forekomst av mikroorganismer som kan benytte organisk stoff som næring (heterotrofe mikroorganismer). Kimtallsanalyser kan utføres ved to ulike dyrkingstemperaturer, 22 og 36°C. Det er viktig å være klar over at kimtallet ved disse to temperaturene beskriver forekomst av to hovedgrupper mikroorganismer i

vannet. Ved 22°C vil de mikroorganismene som er tilpasset lave temperaturer (psykrotrofe/psykrofile) vokse best. Det naturlige reservoaret til disse mikroorganismene er jord og vann, og betegnes også som normal mikroflora i vannet. Mikroorganismer i denne gruppen kan bl.a. forårsake begroing i ledningsnett og bedervelse av næringsmidler. Ved 36°C vil mesofile mikroorganismer vokse best. Det naturlige reservoaret til denne gruppen mikroorganismer er varmblodige dyr og mennesker. I vannmikrobiologien betegnes slike mikroorganismer

som forurensingsflora. Kimtallsanalyser ved 36°C gir derfor en indikasjon på om vannet inneholder mikroorganismer som skyldes forurensing.

Koliforme bakterier og *Escherichia coli*. Koliforme bakterier er ingen presis mikrobiologisk definisjon, men er en praktisk betegnelse på bakterier som tilhører familien *Enterobacteriaceae* og som har evne til å forgjære laktose. Fire slekter med bakterier utgjør de viktigste koliforme bakteriene, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* og *Klebsiella*. I sjeldnere tilfeller kan det påvises laktose positive stammer av bakterier tilhørende f. eks *Serratia* og *Hafnia*. Hovedreservoaret til koliforme bakterier er tarmen til varmblodige dyr og mennesker. *Citrobacter*, *Enterobacter* og *Klebsiella* påvises også regelmessig fra jord og plantemateriale. Derfor er en påvisning av koliforme bakterier ikke en sikker indikasjon på fekal forurensing. Det er usikkert i hvilken grad laboratorieundersøkelser kan skille mellom koliforme bakterier som kommer fra fekal forurensing eller fra miljøet. Den eneste slekten innen gruppen koliforme bakterier som bare har tarm som naturlig reservoar er *Escherichia*. Arten *E. coli* er derfor en spesifikk fekal indikator. Påvises *E. coli* i vann er det et sikkert tegn på at vannet er fekalt forurenset. De fleste smittestoffene som kan overføres med vann har fekal-oral smittevei. Dersom det er sjuke individer eller friske smittbærere i tilsigsområdet kan et fekalt forurenset vann inneholde smittestoffer. Dette prinsippet danner grunn-

laget for bruk av indikatorbakterien *E. coli* i drikkevannshygiene. I den gamle forskriften ble det benyttet begrepet termotolerante koliforme bakterier (TKB). Det har imidlertid vist seg at enkelte stammer av *Enterobacter*, *Klebsiella* og *Citrobacter* kan være termotolerante. Ved å gå over til *E. coli* har vi fått en mer feces-spesifikk hygienisk parameter i drikkevannsmikrobiologien. Ved gjennomføring av en risikovurdering i tilsigsområde og vannkilde vil det være nyttig med samtidig undersøkelse for koliforme bakterier og *E. coli*. Resultatene kan gi informasjon om betydningen av punktutslipp i forhold til diffus forurensing gjennom overflateavrenning.

Intestinale enterokokker. Utviklingen i mikrobiologisk taksonomi, i hovedsak basert på genetiske teknikker, har blant annet ført til at de fleste av de bakteriene som tidligere ble betegnet som fekale streptokokker nå er blitt plassert i en egen slekt, *Enterococcus*. Reservoaret til denne bakteriegruppen er hovedsakelig tarmen til varmblodige dyr og mennesker. Flere intestinale enterokokker kan også ha et reservoar i miljøet. Påvises intestinale enterokokker i vann uten at det samtidig påvises *E. coli* bør et slikt resultat tolkes forsiktig. Slike funn kan ha flere årsaker. Det kan være bakterier som stammer fra miljøet, eller det kan være fekal forurensing som stammer fra dyr. De aller fleste dyreartene har et mye høyere antall intestinale enterokokker enn *E. coli* i feces. Hos mennesker er forholdet motsatt. I human feces er innholdet av *E. coli*

langt høyere enn intestinale enterokokker. Dessuten kan en artsdiagnose av påviste intestinale enterokokker indikere hvor de kommer fra. Intestinale enterokokker overlever noe lengre enn *E. coli* i ferskvann, og de er vanligvis noe mer motstandsdyktige mot ytre miljøpåvirkninger.

*Clostridium perfringens*. Sporedannende anaerobe bakterier har i mange år vært en støtteparameter ved mikrobiologisk undersøkelse av drikkevann. Tidligere ble gruppen sulfittreduerende klostridier (SRK) benyttet som parameter, og hovedformålet med denne parameteren er at den kan påvise gammel eller periodevis fekal forurensing. *C. perfringens* (CP) er den viktigste arten av SRK. Den påvises regelmessig i feces fra varmblodige dyr og mennesker, men i et mye lavere antall enn *E. coli*. Sporenes evne til å overleve i naturen i mange år gjør det vanskelig å vurdere om kilden til påviste CP er fekal forurensing eller bunnsedimenter, jord og råtnende plantemateriale. Det er derfor viktig å sammenholde en evt. forekomst av CP med forekomst av *E. coli*. Påvisning av CP skal, i henhold til den nye drikkevannsforskriften, medføre en vurdering av muligheten for tilførsel av patogene mikroorganismer, i første rekke encellede parasitter. Sammenhengen mellom CP og parasittcyster i råvann har vist seg å være usikker. Imidlertid har bakteriesporer og parasittcyster relativt like egenskaper i forhold til vannbehandling. Påvisning av CP i drikkevann indikerer derfor at vannbehandlingen ikke er en tilstrekkelig hygienisk bar-

riere med hensyn på parasittcyster. Et annet poeng er at sporedannende bakterier, både anaerobe og aerobe, er uønsket i vann til næringsmiddelindustrien. Mange av disse bakteriene er viktige bedervelsesbakterier som kan forårsake forråtnelse og gassproduksjon.

*Pseudomonas aeruginosa*. Dette er en ny parameter i drikkevannsforskriften. *Ps. aeruginosa* er en mesofil bakterie og et viktig reservoar er huden hos mennesker. Parameteren har fått plass blant de mikrobiologiske parameterene for flaskevann. Påvisning av *Ps. aeruginosa* i flaskevann kan indikere dårlig produksjonshygiene eller at grunnvann er forurenset med overflatevann. Det er viktig å skille mellom gruppen fluorescerende pseudomonader og *Ps. aeruginosa*. Fluorescerende pseudomonader er psykrotrofe bakterier som kan utgjøre en del av det heterotrofe kintallet. Disse bakteriene er ofte sterkt proteolytiske og anses som viktige bedervelsesbakterier for næringsmidler.

## Mikrobiologiske referansemetoder

Den nye drikkevannsforskriften angir spesifikke referansemetoder som skal benyttes ved mikrobiologisk analyse av drikkevann. Det kan, i henhold til EU-direktiv 98/83/EF, benyttes alternative metoder dersom det kan dokumenteres at de er likeverdige eller bedre enn referansemetoden. Dessuten kan andre metoder benyttes i forbindelse med internkontroll i vannverk og andre næringsmiddelvirksomheter.

Kimtall. Drikkevannsforskriften angir NS-EN ISO 6222 som referansemetode. Etter denne metoden påvises heterotrofe mikroorganismer med evne til å danne synlige kolonier i et substrat som inneholder organisk stoff. Metoden skiller mellom kimtall ved 22°C og 36°C, det vil si at psykrotrofe/psykrofile og mesofile mikroorganismer i hovedsak påvises ved henholdsvis 22°C og 36°C.

Koliforme bakterier og *E. coli*. For disse to parameterene er NS-EN ISO 9308-1 angitt som referansemetode og Colilert-18/Quantitray som alternativ metode. Referansemetoden angir Laktose TTC agar med tergitol 7 (TTC-agar) som primært dyrkingsmedium. Dette mediet er lite selektivt. Det betyr at andre mikroorganismer enn det som skal påvises kan vokse og forårsake problemer ved avlesing og telling. Metoden er i standarden avgrenset til desinfisert vann og annet vann med lavt innhold av mikroorganismer. For norske forhold, med mye overflatevann som råvann og fortsatt en del mindre vannverk som ikke har tilfredsstillende desinfeksjon, vil referansemetoden være vanskelig å anvende. Det vil derfor i mange situasjoner være nødvendig å anvende alternative metoder. I flere andre europeiske land var oppfatningen den samme, og det har vært utført et felles europeisk arbeid for å bli enige om hvordan en alternativ metode skal dokumenteres som likeverdig med referansemetoden. En protokoll for en slik sammenligning ble utviklet og denne protokollen ble testet ut for Colilert-18/Quantitray i sammenlign-

ing med referansemetoden. I undersøkelsen deltok 20 laboratorier fra 13 land og Colilert-18/Quantitray viste seg å være likeverdig eller bedre enn referansemetoden for både koliforme bakterier og *E. coli*. Den norske delen av undersøkelsen var i overensstemmelse med hovedkonklusjonene.

Det er et viktig skille mellom disse to metodene, TTC-metoden og Colilert-metoden. For koliforme bakterier er TTC-metoden basert på laktoseprinsippet der det registreres dannelse av syre ved forgjæring av laktose. Colilert-metoden er basert på enzymprinsippet der aktiviteten til enzymet  $\beta$ -D-galaktosidase (GAD) registreres. GAD er det første enzymet i en lang rekke biokjemiske reaksjoner som fører til dannelse av syre og evt. gass ved forgjæring av laktose. Ved denne reaksjonen brytes disakkaridet laktose ned til to monosakkarider. GAD er angitt å være spesifikt for gruppen koliforme bakterier. Denne prinsipielle forskjellen ved metodene kan forklare at det ofte registreres betydelige høyere konsentrasjoner av koliforme bakterier med Colilert-metoden enn med metoder basert på laktoseforgjæring (TTC-agar, LES Endo-agar m.fl). En mulig årsak til dette er at koliforme bakterier som har etablert seg i miljøet ikke har hele enzymrekken for å forgjære laktose i aktiv tilstand. Slike bakterier vil ikke bli regnet som koliforme etter laktose-prinsippet, men etter enzymprinsippet vil de bli registrert på grunn av GAD-aktivitet. De "miljøkoliforme" bakteriene har liten hygienisk relevans, men vil indikere i hvilken grad vannkilden er sårbar for

avrenning og diffuse forurensinger.

I drikkevannsforskriften er NS 4788 og NS 4792 angitt som referansemetoder for henholdsvis koliforme bakterier og termotolerante koliforme bakterier/presumptiv *E. coli*. Dersom det ikke her er ment metoder som er akseptable i overgangsperioden fram til 1. november 2003 er det vanskelig å forstå begrunnelsen for disse referansemetodene. Disse metodene avviker fra det som er angitt som referansemetoder i EU-direktivet, og det kan stilles spørsmålsteget ved det enkelte lands adgang til å definere egne referansemetoder. Termotolerante koliforme bakterier er videre ingen parameter i den nye forskriften, så behovet for en referansemetode for denne parameteren er ikke til stede. Når det gjelder koliforme bakterier analysert i henhold til NS 4788 kan det være en aktuell alternativ metode for undersøkelser av råvann og drikkevann som ikke er desinfisert. De veilederene som myndighetene er i gang med å utarbeide bør klargjøre dette forholdet.

Intestinale enterokokker. NS-EN ISO 7899-2 er stort sett identisk med den gamle norske standarden for fekale streptokokker (NS 4793). Det benyttes det samme primærmediet, Slanetz og Bartley medium, og inkubasjonstiden er to døgn. Forskjellen ligger i verifiseringstrinnet. Dersom det påvises typiske kolonier etter primærinkubasjon skal disse testes for esculin-hydrolyse. Nå utføres det ved å flytte hele membranfilteret over på galle-esculin agar og videreinkubere i 2 timer ved 44°C.

Tidligere måtte den enkelte koloni sås ut på galle-esculin agar og inkuberes i ett døgn før avlesing. Etter den nye standarden framkommer et positivt analyseresultat etter to døgn mot tidligere tre døgn. Dessuten er katalasereaksjonen fjernet som bekreftende undersøkelse for intestinale enterokokker.

*Clostridium perfringens*. Som referansemetode har EU-direktivet angitt mCP-agar. Dette mediet ble beskrevet av Bisson og Cabelli i 1977, og muliggjør påvisning og telling av *C. perfringens* i løpet av ett døgn. Svakheten med dette valget av referansemetode var at dyrkingsmediet ikke var tilgjengelig kommersielt før i 2001. Dessuten fins det ingen internasjonal standard som beskriver metodikk basert på dette dyrkingsmediet. Dette betyr et større krav til validering av metoden ved det enkelte laboratorium før mCP-metoden kan akkrediteres. I regi av ISO og CEN har mCP-mediet og påvisning og telling av *C. perfringens* i henhold til ISO 6461-2 vært sammenlignet. I henhold til ISO-metoden og den norske utgaven NS-ISO 6461-2 er det sulfittreduerende anaerobe bakterier som påvises. Det er derfor nødvendig med bekreftende undersøkelser for å stille diagnosen *C. perfringens*. Resultatene fra ulike sammenlignende utprøvinger tyder på at de to metodene er likeverdige når det gjelder *C. perfringens*. Det er viktig å være klar over at påvisning av *C. perfringens* i henhold til ISO-metoden tar minimum tre døgn, mens mCP-metoden tar ett døgn. Dessuten er mCP-metoden en grei metode å

avlese, så det vil være et laboratoriemessig framskritt å velge denne metoden framfor den alternative NS-ISO 6461-2 .

*Pseudomonas aeruginosa*. I forskriften er prEN-ISO 12780 angitt som referansemetode. Metoden er basert på membranfiltreringsteknikk og muligjgør undersøkelse av 250 ml prøvevolum direkte. Denne metoden er nå ute til avstemming i CEN-landene, og det kan forventes at metoden blir endelig vedtatt i 2002. Da vil det ta 6 måneder før NS-EN ISO 12780 vil foreligge. De fleste stammene av *Ps. aeruginosa* produserer pigmentet pyocyanin og gir koloniene på primærmediet en blågrønn farge. For denne typen kolonier trengs det ingen bekreftende undersøkelser. Primærmediet er gjort selektivt ved tilsetning av de antibiotiske stoffene cetrimid og nalidixinsyre. De selektive komponentene hemmer bakgrunnsflora i vokse fram til kolonier som kan forstyrre avlesingen. Enkelte stammer av bakterien pro-

duserer ikke pyocyanin, og for ikke å "miste" disse bakteriene i undersøkelsen er det angitt videreundersøkelser for fluorescerende og rødlig pigmenterte kolonier.

## Konklusjon

Den nye drikkevannsforskriften angir mikrobiologiske parametere og metoder som skal benyttes ved drikkevannsanalyser. I første rekke benyttes analyseresultatene til å dokumentere at vannet er hygienisk betryggende. Dersom den mikrobiologiske kvaliteten ikke er tilfredsstillende kan mikrobiologiske analyser være nyttige verktøy ved problemløsning og for å måle effekten av iverksatte tiltak. De parametrene og de metodene som er angitt bør være et godt grunnlag for analyseresultater basert på faglig tilfredsstillende prinsipper. Imidlertid er det viktig å holde øynene oppe for nye og bedre metoder som kan gi minst like sikre analyseresultater på kortere tid. Det vil være ønskelig fra både vannverksiere, myndigheter og analyselaboratorier.