

Manual för analys av bakteriehalt i vatten: totalhalt
- bestämning med ingjutningsmetoden, koliforma
bakterier och *E.Coli* - bestämning med
membranfiltermetoden.

Karin Berg, Malin Lundin och Jessica Petersson

Miljövetarprogrammet
Linköpings universitet, Campus Norrköping

7 november 2001

Innehåll

1 Inledning	2
2 Användningsområde och begränsningar	2
3 Definitioner	2
4 Principer	3
5 Odlingssubstrat	3
6 Kemikalier och lösningar	4
7 Utrustning	4
7.1 Provtagning	4
7.2 Membranfiltrering	4
7.3 Inkubering och odling av bakterier	5
8 Provtagning	5
8.1 Förberedelser	5
8.1.1 Diskning	5
8.1.2 Sterilisering	5
8.2 Provtagning	5
9 Filtrering och odling	6
9.1 Förberedelser	6
9.2 Filtrering	6
9.3 Odling av bakterier	7
9.3.1 Totalantal	7
9.3.2 Koliforma bakterier och <i>E.coli</i>	7
9.3.3 Identifiering	7
9.3.4 Vidareodling	7
9.3.5 Oxidastest (koliforma bakterier)	7
9.3.6 Enrörsmetoden (<i>E.coli</i>)	8
10 Resultatberäkning	8
10.1 Totalantal	8
10.2 Koliforma, <i>E.coli</i>	8

1 Inledning

Vid bedömning av vattenkvalitet är det viktigt att bestämma bakteriehalten. Det första som undersöks är vanligtvis den totala halten bakterier. En hög bakteriehalt kan orsaka ögon- och öroninfektioner och är dessutom ett tecken på att vattnet kan vara förorenat. Men en hög bakteriehalt betyder inte nödvändigtvis att det finns många patogena (sjukdomsalstrande) bakterier i vattnet. För att bestämma detta krävs andra metoder.

Vatten innehåller ett myller av bakterier och det kan vara svårt att upptäcka de patogena, därför används ofta indikatorbakterier. De vanligaste indikatorbakterierna är termotoleranta koliforma bakterier, varav *E.coli* är den art man oftast söker efter. Förekomst av dessa bakterier tyder på att det finns fekalier i vattnet, vilket i sin tur innebär att det kan finnas patogena mag- och tarmbakterier i vattnet. Koliforma bakterier kan förekomma i fekalier, men även komma från jord eller processvatten från pappersbruk. *E.coli* däremot är endast av fekalt ursprung, därför är det av större intresse att ta reda på halten *E.coli*. Anledningen till att man istället för patogena mag- och tarmbakterier undersöker halten *E.coli* är att de överlever längre i vatten.

2 Användningsområde och begränsningar

Manualen beskriver metoder för analys av totalantal bakterier (med ingjutningsmetod) och av koliforma bakterier och *E.coli* (med membranfiltermetod) i naturvatten. Membranfiltermetoden bör ej användas till vatten som har hög halt av partiklar och kolloidala substanser eftersom filtret då kan bli tilltäppt. Det man bör tänka på vid val av filterstorlek är att samma typ av bakterier kan ha olika storlek beroende på vilken miljö de lever i.

De olika momenten i manualen är baserade på fyra SIS-standarder enligt följande: Provtagning enl. SS 02 81 63, membranfiltrering enl. SS 02 81 65, koliforma, termotoleranta koliforma och *E.coli* enl. SS 02 81 67 och Totalantal enl. SS 02 81 712.

3 Definitioner

Totalantal betyder här antal aeroba och fakultativt anaeroba heterotrofa bakterier. Dessa växer och ger synliga kolonier efter inkubering (20 ± 1)°C eller ($30\pm 0,5$)°C under (48 ± 2)h på jästpeptonagarsubstrat.

Koliforma bakterier är oxidasnegaiva bakterier som vid aerob odling på LES-endoagarsubstrat bildar syra och aldehyd inom (24 ± 4)h vid inkubering i ($35\pm 0,5$)°C.

Termotoleranta koliforma bakterier bildar syra inom (24 ± 4)h vid inkubering i ($44\pm 0,5$)°C på M-FC-substrat.

E.coli är en Gram-negativ, termotolerant koliform bakterie som bildar gas från laktos såväl som indol ur tryptofan inom (24±4)h vid inkubering i (44±0,5)°C.

4 Principer

Jästpeptonagar (YPA) är ett vanligt odlingssubstrat för framodling av bakterier. Här används det för att odla fram heterotrofa bakterier ur ofiltrerat provvatten och för vidareodling av koliforma bakterier och *E.coli*.

Koliforma bakterier fångas vid filtrering upp med hjälp av ett membranfilter med tillräckligt liten porvidd (högst 0.45µm). Membranet läggs sedan på LES-endoagar eller M-FC-substrat beroende på om det är koliforma bakterier i allmänhet eller bara *E.coli* man är intresserad av att odla fram. Ska halten *E.coli* undersökas odlas först termotoleranta koliforma bakterier fram och sedan bestämmer man hur många av dessa som var *E.coli*.

LES-endoagarsubstrat innehåller fuksin, som oxideras när laktosjäsande bakterier växer. Kolonierna blir då mörkröda och oftast metallglänsande. Substratet är selekterande, dvs tillsatta ämnen hindrar tillväxt av icke-koliforma bakterier.

M-FC-substrat (Membrane Faecal Coliform) innehåller en pH-indikator, anilinblått. När laktosjäsande bakterier bildar syra färgas dessa kolonier blå. Hög temperatur hindrar tillväxt av de koliforma bakterier som inte är termotoleranta. Även M-FC-substratet är selekterande och innehåller tillsatser som hindrar tillväxt av Gram-positiva organismer.

LTLSB (LaktosTryptonLaurylSulfatBuljong) innehåller laktos och tryptofan. *E.coli*-bakterierna jäser laktosen varvid det bildas syra och gas. Bakterierna använder sig även av tryptofanet varvid det bildas indol. Om indol har bildats färgas buljongens ytskikt rött vid tillsats av Kovács reagens. Gasbildning och rödfärgning indikerar förekomst av *E.coli*-bakterier.

Vid både filtrering och odling är det viktigt att ha en steril miljö för att undvika kontaminering. Handskar och skyddsrock ska användas. Munskydd behövs normalt sett inte, eftersom koliforma bakterier och *E.coli* vanligtvis inte finns i munnen. Vid odling för totalantalsbestämning kan munskydd dock behövas om man pratar mycket el. dyl.

5 Odlingssubstrat

Odlingssubstrat och buljonger	Användningsområde
Jästpeptonagarsubstrat	Samtliga analyser.
LES-endoagarsubstrat	Koliforma
LTLSB	<i>E.coli</i>
M-FC	<i>E.coli</i>

Samtliga substrat tillreds enligt SS 02 81 67, bilaga A.

6 Kemikalier och lösningar

Kovács reagens	För bestämning av <i>E.coli</i>
Peptonvatten	1g pepton löses upp i 100 ml avjoniserat vatten. Autoklavera i 15 min vid en temperatur av $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Det färdiga peptonvattnets pH skall vara $(7,0\pm 0,1)$. Obs! Peptonvattnet kan förvaras i högst två månader i kylskåp.

7 Utrustning

Laboratoriet bör ha tillgång till torrsterilisator eller autoklav för sterilisering av utrustning. Det bör även finnas inkubator (inkubatorbad, inkubationsskåp eller dylikt).

7.1 Provtagning

Provtagningsflaskor	Flaskor, minst 500 ml, av genomskinligt, ofärgat material och försedda med tättslutande lock (propp). Flaskor och lock ska tåla sterilisering och materialet får varken verka tillväxthämmande eller tillväxtfrämjande.
Flaskhållare	Förlängningsbar käpp med hållare av obrännbart material som klarar av sterilisering med t.ex. gasolbrännare.
Termometer	Termometer med mätfel inom $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
Transportförpackning	Termobox eller dylikt, väl rengjord, som kan hålla proven vid en temperatur av $4-8^{\circ}\text{C}$.

7.2 Membranfiltrering

Filtrerapparat	Av glas, plast eller rostfritt stål med steriliserbar stödplatta och tratt och försedd med ventil för att applicera respektive utjämna undertryck. Steril engångsutrustning kan användas. Anslut filtrerapparaten till en sugkolv eller motsvarande och därefter (ev. via en säkerhetsflaska) till en vattensug eller vakuumpump.
Membranfilter	Sterila vita membranfilter med porvidd på högst $0,45\ \mu\text{m}$. Gärna rutmönstrade på ovansidan för att underlätta avläsning.
Pipetter	Förpacka pipetterna i kassetter eller motsvarande och torrsterilisera under minst en timma vid en temperatur av $(160\pm 5)^{\circ}\text{C}$, eller förpacka pipetterna i papper eller steriliseringspåse och autoklavera under 20 min vid en temperatur av $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$.
Pincetter	Sterila, platta pincetter med avrundade spetsar med plana insidor för att undvika skador på membranfilter.

Mätcylindrar Täck mätcylindrarnas öppning med aluminiumfolie och torrsterilisera under minst en timma vid $(160\pm 5)^{\circ}\text{C}$, eller förpacka mätcylindrarna i papper eller steriliseringspåse och autoklavera under 20 min vid en temperatur av $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

7.3 Inkubering och odling av bakterier

Petriskålar	Sterila petriskålar av plast.
Provrör	Med proppar. Används vid enrörsmetod för konfirmering av <i>E.coli</i> .
Platinaöglor (platinöser)	Sterilförpackade, 10 μl och 1 μl .
Oxidastest	Oxidastrips. För konfirmering av koliforma bakterier.

8 Provtagning

Bakteriehalten i vatten kan vara olika beroende på var och när provet tas. Vattenprov för mikrobiologiska undersökningar skall därför tas så att det är representativt för de förhållanden undersökningen avser. Tänk på att ytskiktet har en annan sammansättning än vad vatten på annat djup har. Antalet mikroorganismer i vattenprov kan påverkas bl a av tid och temperatur, mikrofloras sammansättning, mängden suspenderade ämnen och näringstillgången i vattnet samt vissa övriga kemiska egenskaper. Tiden mellan provtagningen och laboratorieundersökningen bör därför vara så kort som möjligt och helst inte överstiga 10 timmar för ett kylt prov eller fyra timmar för ett icke kylt.

8.1 Förberedelser

8.1.1 Diskning

Diska flaskorna med diskmedel och varmt vatten. Skölj noga först med varmt vatten och sedan upprepade gånger med destillerat vatten.

8.1.2 Sterilisering

Flaskor kan autoklaveras vid 121°C i 20 min eller torrsteriliseras under minst 1 h vid en uppnådd temperatur av 160°C .

8.2 Provtagning

Vid provtagning av ytvatten bör ett antal provtagningspunkter väljas helst några meter från strandkanten, så att proverna tillsammans blir så representativa som möjligt. De lokala förutsättningarna kan vara mycket olika varför provtagaren får avgöra hur vattenproven skall tas. Före provtagningen bör provtagaren tvätta och

skölja händerna noga. Alternativt kan sterila engångshandskar eller oanvända plastpåsar användas. Om det är lätt att nå vattenytan tas provet direkt i flaskan, annars används flaskhållare. Om flaskhållare används ska den steriliseras genom flambearing i gasollåga. Provtagaren skall sänka ned flaskan hastigt 10-20 cm under vattenytan och fylla den till 4/5 genom att hålla mynningen mot strömriktningen eller - i stillastående vatten - genom att föra flaskan framåt. För att undvika att få med ytfilm i provet bör flaskans kork skruvas av och på under vatten om det är möjligt. Lämplig provvolym kan vara ca 400 ml. Mät temperaturen på de djup där vattenprovet togs ut. Ange temperaturen med en noggrannhet på $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

9 Filtrering och odling

9.1 Förberedelser

Gör i ordning följande substrat och lösningar:

- Peptonvatten för membranfiltreringen.
- Flytande YPA för odling av totalantal bakterier.
- Plattor med LES-endoagarsubstrat för odling av koliforma bakterier.
- Plattor med M-FC-substrat för odling av termotoleranta koliforma bakterier.
- YPA-plattor för vidareodling av koliforma och termotoleranta koliforma bakterier.
- Provrör med LTL SB för konfirmering av *E.coli*.

9.2 Filtrering

Alla instrument skall vara steriliserade och förvaras sterila under hela analysen. Sterilisering av flaskhalsar och pincett ska ske med gasolbrännare mellan varje moment. Vid filtrering av små volymer, t.ex. 10 ml, ska membranfiltret sköljas med peptonlösning både före och efter filtrering för att vara säker på att få med alla bakterier.

Placera det sterilförpackade membranfiltret i filtreringsapparaten med hjälp av pincett. Håll i lite peptonlösning så att filtret fuktas (gäller för 10 ml). Ta upp bestämd mängd lösning med pipett och håll i filtreringsapparaten. Vänta tills allt vatten har runnit igenom filtret, skölj därefter med peptonlösning längst filtreringsapparatus kanter så att alla bakterier kommer med på filtret. Placera därefter filtret, med hjälp av pincett, på respektive agarplattor (LES-endoagar eller M-FC).

9.3 Odling av bakterier

9.3.1 Totalantal

Häll 1 ml respektive 0,1 ml ofiltrerat prov i tomma petriskålar. Tillsätt flytande YPA och blanda försiktigt så att det fördelas jämt i skålarna. Vänte tills YPA har stelnat och inkubera sedan i $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ i $(48\pm 2)\text{h}$.

9.3.2 Koliforma bakterier och *E.coli*

Membranfilter från filtrering av 10 ml och 100 ml provvatten läggs på LES-endoagarplattor för att odla fram koliforma bakterier. Filter från filtrering av 100 ml provvatten läggs på M-FC-substrat för att odla fram termotoleranta koliforma bakterier, från vilka man sedan kan bestämma antal *E.coli*. Inkubera i värmeskåp: LES-endoagarplattor $(24\pm 4)\text{h}$ i $(35\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ och M-FC plattor $(24\pm 4)\text{h}$ i $(44\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$.

9.3.3 Identifiering

Efter det att proverna inkuberats i $(24\pm 4)\text{h}$ respektive $(48\pm 2)\text{h}$ räknas bakteriekolonierna på alla plattor och identifieras enligt följande. Totalantal: alla kolonier på YPA. Koliforma: rosa till mörkröda med metallglänsande yta på LES-endoagarsubstrat. Termotoleranta koliforma: blå yta på M-FC-substrat.

9.3.4 Vidareodling

Efter att kolonierna räknats förs de koliforma och termotoleranta kolonierna över från sina ursprungsplattorna till YPA- plattor för vidareodling (koliforma till en platta och termotoleranta till en annan platta).

Dela in varje YPA-platta i förslagsvis fem lika stora sektioner genom att rita med en penna på baksidan av varje platta. För därefter över varje koloni med hjälp av en steriliserad platinös ($1\mu\text{l}$). Doppa försiktigt ned platinösen i kolonien så att bakterierna fastnar. Stryk ut bakterierna på en av sektionerna genom att försiktigt, utan att trycka för hårt, dra spetsen av platinösen över YPA i ett sicksackmönster. Byt platinös mellan varje koloni för att undvika kontaminering. Platinöserna samlas upp i behållare för farligt avfall. Inkubera plattorna $(24\pm 4)\text{h}$ i $(44\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Efter inkuberingen kontrolleras tillväxten på plattorna.

Om tillväxt har skett görs nu ytterligare tester för att säkerställa att de kolonier som odlats fram är koliforma (från LES-endoagarsubstratet) eller *E.coli* (från M-FC substratet). Detta görs med oxidastest respektive enrörsmetoden.

9.3.5 Oxidastest (koliforma bakterier)

Alla fem sektionerna på YPA plattan testas genom att föra över bakterier från plattan till en del av ett oxidastrips. Om oxidastripset färgas blått är bakterierna oxidationspositiva, dvs icke-koliforma. Om stripset förblir ofärgat är kolonin av koliform art.

Doppa en steril platinös (1 μ l) i bakteriekolonin på YPA plattan. Bstryk en del av ett oxidasstrips med platinösen och vänta i 10 sekunder. Notera om stripset färgas blått eller förblir ofärgat. Gör likadant på bakteriekolonier från alla sektioner på YPA-plattan (ursprung LES-endoagarplatta). Byt platinös mellan varje sektion för att undvika kontaminering. Platinöserna samlas upp i behållare för farligt avfall.

9.3.6 Enrörsmetoden (*E.coli*)

Enrörsmetoden används för att bestämma om kolonierna på YPA-plattan (uppodlat från M-FC) är *E.coli*. Bakteriekolonier från respektive sektion förs med hjälp av en platinös (10 μ l) över till provrör innehållande LTL5B. Skaka försiktigt av bakterierna i röret. Rören inkuberas sedan i värmeskåp, (35 \pm 0,5) $^{\circ}$ C i (24 \pm 4)h. Efter inkubationen tillsätts 1-2 droppar Kovács reagens i varje rör, observera att momentet ska utföras i dragskåp. Observera eventuell färgförändring i buljongen. Svaret är positivt om buljongens ytskikt färgas rött vid tillsättning av Kovács reagens.

10 Resultatberäkning

10.1 Totalantal

Antal aeroba och fakultativt anaeroba heterotrofa bakterier i ett vattenprov räknas ut som

$$M = \frac{\sum C_i}{\sum V_i} \quad (1)$$

där

M = antalet kolonier per ml prov

C = antal räknade kolonier

V = provvolym i ml

Ange resultatet som bakterier per ml prov. Antal över 10 avrundas till hela 10-tal.

10.2 Koliforma, *E.coli*

Antal koliforma bakterier av olika slag räknas ut som

$$C_s = \frac{N}{(n_1V_1) + (n_2V_2) + \dots + (n_iV_i)} V_s \quad (2)$$

där

C_s = den beräknade halten mikroorganismer i referensvolymen

N = summan av alla räknade kolonier på alla räknade filter

n_1, n_2, \dots, n_i = antalet räknade filter för varje analyserad volym V_1, V_2, \dots, V_i

V_1, V_2, \dots, V_i = volymen som filtrerades

V_s = referensvolym i vilken halten mikroorganismer skall anges (till exempel per 100 ml)

Observera att antal *E.coli* och antal koliforma bakterier räknas ut var för sig eftersom det rör sig om två skilda undersökningar. *E.coli* ska alltså inte ingå i antal koliforma bakterier, även om den är en koliform bakterie.

Referenser

- [1] SS 02 81 63 Vattenundersökningar- Mikrobiologisk undersökning- Provtagning. Utgåva 2, 1990.
- [2] SS 02 81 71 Vattenundersökningar- Heterotrofa aeroba och fakultativt anaeroba bakterier i vatten- Bestämning med ingjutningsmetoden. Utgåva 1, 1985.
- [3] SS 02 81 65 Vattenundersökningar- Mikrobiologisk undersökning- Membranfiltreringsmetod. Utgåva 3, 1998.
- [4] SS 02 81 67 Vattenundersökningar- Koliforma bakterier, termotoleranta koliforma bakterier och *Escherichia coli* i vatten- Bestämning med membranfiltreringsmetod. Utgåva 2, 1996.