



VEDEN KOLIFORMISTEN BAKTEERIEN LUKUMÄÄRÄN MÄÄRITYS PUTKIMENETELMÄLLÄ

Bestämning av antalet coliforma bakterier i vatten med rörmotoden

Water quality. Detection and enumeration of coliform bacteria

by enrichment in a liquid medium

Sisällys

- 1 Johdanto
 - 2 Soveltamisala
 - 3 Viittaukset
 - 4 Määritelmät
 - 5 Periaate
 - 6 Laitteet ja välineet
 - 7 Kasvualustat ja kemikaalit
 - 8 Näyte
 - 9 Suoritus
 - 10 Tulosten laskeminen
 - 11 Tulosten ilmoittaminen
- Opastavia tietoja

1 JOHDANTO

Juomaveden kautta leviävät taudit ovat ennenkaikkea erilaisia suolistosairauksia, joissa tartunnanaiheuttajat (bakteerit, virukset, alkueläimet) esiintyvät eläinten ja ihmisen ulosteissa. Vedessä tautia-aiheuttavat (patogeeniset) mikrobit esiintyvät yleensä pieninä pitoisuuksina verrattuna luonnollisiin suolistobakteereihin (1). Menetelmiä erilaisten tautia aiheuttavien mikrobin osoitukseen vedestä on olemassa, mutta ne ovat usein työläitä ja kalliita. Kaikille taudinaiheuttajille ei ole olemassa luotettavia osoitusmenetelmiä. Jos vesistä haluttaisiin suoraan osoittaa taudinaiheuttajat, se olisi tehtävä jokaiselle taudinaiheuttajalle eri menetelmällä. Sen vuoksi veden mikrobiologisessa rutiinivalvonnassa etsitään erilaisia indikaattoribakteereita, joita on eläinten ja ihmisen ulosteissa.

Ulosteiden aiheuttaman saastutuksen parhaana indikaattorina pidetään **Escherichia coli** lajia. **E. coli** esiintyminen katsotaan ulostesaastutuksen osoitukseksi, kun taas muut koliformiset bakteerit voivat olla ulosteista peräisin, mutta niitä voi myös muutoin esiintyä maassa ja vedessä. Näistä muista lajeista vain harvat, lämpökestoiset koliformiset bakteerit, kykenevät kasvamaan 44,5 °C lämpötilassa. **E. coli** kuuluu tähän joukkoon, mutta sen erottamiseen muista tarvitaan lisäksi vähintään indolitestit.

2 SOVELTAMISALA

Tässä standardissa kuvataan putkimenetelmät (SFS 4447) koliformisten bakteerien kokonaismäärän ja lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrittämiseksi. Lisäksi esitetään menetelmät **E. coli** alustavaksi tunnistukseksi. Näiden indikaattoribakteerien alustava määrittäminen ja varmistus tehdään määrittäyssä järjestyksessä. Analyysin laajuus riippuu vesinäytteestä ja tarvittavasta tiedosta.

Putkimenetelmiä voidaan käyttää tutkittaessa erilaisia vesiä, kuten juomavettä, raakavettä, uimavettä, vastaanottavan vesistön vettä ja jätevettä. Ne soveltuvat myös käytettäväksi puhdistamolietteen, sedimentin ja maaperän tutkimiseen edellyttäen, että bakteerit on saatu tasaisesti jakautumaan näytteeseen.

On huomattava, että putkimenetelmä on epätarkka (SFS 4447). Yleisemmin ovat käytössä kalvosuodatusmenetelmät SFS 3950, koliformisten bakteerien kokonaismäärälle SFS 3016 ja lämpökestoille koliformisille bakteereille SFS 4088. Jos näyte on samea tai sisältää kalvolle pidäytyviä ja bakteerien kasvua estäviä aineita, käytetään putkimenetelmää. Suurempi osa esim. desinfektiossa vaurioituneista bakteereista voidaan saada esiin putkimenetelmällä kuin kalvosuodatusmenetelmällä etenkin, jos kalvosuodatusmenetelmässä käytetään etsityn organismin maksimikasvulämpötilaa lähellä olevaa lämpötilaa ilman esi-inkubointia alemmassa lämpötilassa.

3 VIITTAUKSET

- SFS 3016 Veden koliformisten bakteerien kokonaismäärän määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä.
- SFS 3950 Kalvosuodatusmenetelmä veden mikrobiologisessa tutkimuksessa.
- SFS 3951 Vesinäytteenotto mikrobiologista tutkimusta varten.

SFS 4088 Veden lämpökestoisten (fekaalisten) koliformisten bakteerien lukumäärän määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä.

SFS 4447 Putkimenetelmä veden mikrobiologisessa tutkimuksessa.

4 MÄÄRITELMÄT

KOLIFORMISET BAKTEERIT tarkoittaa tässä standardissa fakultatiivisesti anaerobisia, oksidaasi-negatiivisia, gram-negatiivisia, itiötä muodostamattomia sauvabakteereita, jotka fermentoivat laktoosia muodostaen happoa ja kaasua 48 tunnin kuluessa lämpötilassa 35 °C tai vaihtoehtoisesti 37 °C.

LÄMPÖKESTOISET KOLIFORMISET BAKTEERIT tarkoittaa koliformisia bakteereita, jotka lisäksi tuottavat sokerista kaasua 24 tunnissa lämpötilassa 44,5 °C.

E. COLI (ALUSTAVA) tarkoittaa lämpökestoista koliformista bakteeria, joka lisäksi muodostaa indolia tryptofaanista.

5 PERIAATE

Koliformisten bakteerien osoitus ja lukumäärän määrittäminen tietyssä vesitilavuudessa edellyttää rikastusviljelyä ja tarkistus-tutkimusta. Lämpökestoisuuden osoitus ja **E. colin** alustava osoitus edellyttävät vielä lisätestejä. Lämpökestoisen koliformisten ja alustavan **E. colin** osoitus voidaan tehdä ilman koliformien tarkistustutkimusta.

5.1 Rikastusviljely

Näyte inkuboidaan bromikresolipurppura-laktoosi -liemessä lämpötilassa 35 °C tai 37 °C 44 ± 4 h. Koliformiset bakteerit kasvavat tässä alustassa tuottaen laktoosista happoa ja kaasua. Happo aiheuttaa indikaattorin värin muuttumisen violetista keltaiseksi. Kaasun muodostuminen havaitaan koeputken sisään ylösalaisin sijoitetusta kaasunkeräysputkesta (durhamputkesta).

5.2 Tarkistustutkimus

Kaikista positiivisista ja lisäksi sellaisen rikastusviljelyn laimennoksen kasvua osoittavista putkista, joissa yksikin putki osoittaa hapon muodostusta siirrostetaan näytettä brillanttivihreä-sappi-laktoosi -liemeen. Juomavesinäytteitä tutkittaessa olisi hyvä tarkistaa kaikki kasvua osoittavat putket. Kaasun muodostus brillanttivihreä-sappi-laktoosi -liemessä lämpötilassa 35 °C tai 37 °C 44 ± 4 tunnissa on positiivinen tulos.

5.3 Lämpökestoisten koliformisten bakteerien osoitus

Siirros steriileihin lauryyli-tryptooni-mannitoli-tryptofaani-liemiputkiin tehdään rikastusviljelyn bromikresolipurppura-laktoosi -liemiviljelmistä mieluiten heti rikastusviljelyn jälkeen (tai vasta tarkistustutkimuksen jälkeen, jolloin tutkittaviksi valitaan vain sekä rikastusviljelyssä että tarkistustutkimuksessa positiivisen tuloksen antaneet viljelmät). Putkia inkuboidaan vesihauteessa lämpötilassa 44,5 °C 22 ± 2 h. Kaasun muodostus tulkitaan positiiviseksi tulokseksi.

5.4 E. colin alustava osoitus

Alustavana **E. coli** bakteerina pidetään rikastus (5.1) ja/tai tarkistustutkimuksessa (5.2) positiivisen tuloksen antavaa kantaa, joka on lisäksi lämpökestoinen (5.3) ja joka muodostaa tryptofaanista indolia lämpötilassa 44,5 °C 24 tunnissa.

6 LAITTEET JA VÄLINEET

Laimennusveden ja tarvikkeiden sterilointiohjeet on annettu standardissa SFS 3950. Tavanomainen bakteriologisen laboratorion välineistö ja

6.1 Inkubaattori, asetettu lämpötilaan 35 ± 1 °C tai 37 ± 1 °C.

6.2 Inkubaattori, asetettu lämpötilaan 44,5 ± 0,5 °C. Vesihauhe ja haluttaessa lisäksi inkubointikaappi.

6.3 Autoklaavi, asetettu lämpötilaan 121 ± 1 °C ja 110 ± 1 °C.

6.4 Koeputket, esim. 160 ... 180 mm x 16 ... 21 mm borosilikaattilasina.

Pullot esim. 200 ... 300 ml borosilikaattilasina.

6.5 Kaasunkeräysputket, esim. durhamputket 36 mm x 7 mm koeputkiin ja esim. 80 mm x 10 mm durhamputket pulloihin.

7 KASVUALUSTAT JA KEMIKAALIT

Veden tulee olla tislattua tai vastaavaa puhtausastetta.

Tulosten toistettavuuden vuoksi on suositeltavaa käyttää joko hyviksi tunnettuja vedettömiä kasvualusta-aineita ja pro analysis -kemikaaleja tai luotettavan valmistajan kasvualustajauheita tai -rakeita valmistajan ohjeiden mukaan.

pH säädetään tarvittaessa joko 1,0 mol/l natriumhydroksidiliuoksella (40 g NaOH litrassa vettä) tai 1,0 mol/l suolahapolla (82,5 ml väkevää HCl litrassa vettä).

7.1 Laimennusvesi

Valmistus ja käyttö, kuten standardissa SFS 4447 on esitetty.

7.2 Kasvualustat

7.2.1 Bromikresolipurppuralaktoosiliemi (väkevöimätön) (2)

Koostumus:

lihauute	3,0 g
peptoni	10,0 g
NaCl	3,0 g
laktoosi	5,0 g
bromikresolipurppuraliuos	
1 g/100 ml 94 % etanolia	1 ml
tislattu vesi	1000 ml

Liuita lihuute, peptoni ja NaCl veteen ja tarkista, että liuoksen pH on 7,4. Lisää laktoosi liuosta kuumentamalla ja lisää sen jälkeen bromikresolipurppuraliuos. Tarkista, että valmiin alustan pH on 7,4.

Annostele alusta putkiin (esim. 10 ml) tai pulloihin (esim. 100 ml väkevyydeltään kaksinkertaista kasvualustaa), joihin on asetettu kaasunkeräysputki ylösalaisin.

Sulje putket ja pullot. Steriloi ne autoklaavissa väljästi sijoitettuna 15 minuuttia lämpötilassa 110 °C. Jos sterilointi ei vaikuta käytännössä riittävästi näin, voidaan alusta ilman laktoosilisäystä steriloida ensin 15 minuuttia lämpötilassa 121 °C ja laktoosilisäyksen ja annostelun jälkeen uudelleen 15 minuuttia lämpötilassa 110 °C.

Huom. Jos tutkitaan millilitraa suurempia näyte-eriä, on syytä valmistaa väkevyydeltään kaksinkertainen kasvualusta, joka annostellaan tilavuudeltaan tutkittavien näyte-erien kokoisiin eriin. Myös muita kasvualustan väkevyyden näytetilavuus -suhteita voidaan käyttää.

7.2.2 Briljanttivihreä-sappiliemi (2)

Koostumus:

peptoni	10 g
laktoosi	10 g
briljanttivihreäliuos	
0,1 g/100 ml vettä	13 ml
naudansappea	20 g
tislattu vesi	1000 ml

Peptoni ja laktoosi liuotetaan 500 millilitraan vettä. Naudansappi liuotetaan 200 millilitraan vettä ja saadun liuoksen pH säädetään arvoon 7,4 ... 7,5. Molemmat liuokset sekoitetaan keskenään, siihen lisätään 75 millilitraa vettä ja pH säädetään arvoon 7,4. Briljanttivihreäliuos lisätään ja liuoksen määrä täytetään 1000 millilitraksi tislattulla vedellä.

Annostele 10 millilitran erät kasvualustaa koeputkiin, joissa on kaasunkeräysputket ylösalaisin. Sulje putket ja steriloi ne autoklavoimalla niitä väljästi asetettuna 15 minuuttia lämpötilassa 110 °C.

7.2.3 Lauryyli-tryptooni-mannitoli-tryptofaaniliemi (3)

Koostumus:

tryptooni	20 g
mannitoli	5 g
NaCl	5 g
dikaliumvetyfosfaatti, K_2HPO_4	2,75 g
kaliumdivetyfosfaatti, KH_2PO_4	2,75 g
natriumlauryylisulfaatti ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)	0,1 g
L-tryptofaani	0,2 g
tislattu vesi	1000 ml

Ainekset, lukuunottamatta natriumlauryylisulfaattia, liuotetaan kuumentamalla. Sitten lisätään natriumlauryylisulfaatti, joka muutoin vaahtoaisi. pH-arvo säädetään alueelle $6,8 \pm 0,2$. Kasvualusta annostellaan 10 ml eriksi koeputkiin, joihin on sijoitettu kaasunkeräysputket ylösalaisin. Tulpatetut putket steriloidaan autoklaavissa lämpötilassa 115 °C 10 minuuttia.

7.3 Indolireagenssi (4)

Koostumus:

p-dimetyyliaminobentsaldehydi ¹⁾	5,0 g
amyylialkoholi ¹⁾	75 ml
väkevä HCl ¹⁾	25 ml

Reagenssi on keltainen. Kemikaalit eivät kestä hyvin pitkää säilytystä. Kaikki p-dimetyyliaminobentsaldehydi-valmisteet eivät ole tyydyttäviä.

8 NÄYTE

Näyte otetaan ja kuljetetaan, kuten standardissa SFS 3951 mikrobiologisesta näytteenotosta esitetään.

9 SUORITUS

9.1 Näytteen käsittely

Näyte käsitellään ja laimennetaan standardin SFS 4447 mukaisesti. Esimerkkejä sopivista tutkittavista tilavuuksista on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1 Esimerkkejä sopiviksi tutkittaviksi näytetilavuuksiksi koliformisten bakteerien määrittämisessä putkimenetelmällä.

	Putkien tai pullojen lukumäärä x näyte-erän tilavuus
Juoma- ja talousvesi vesilaitoksella	5 x 100 ml, 5 x 10 ml, (5 x 1 ml)
Juoma- ja talousvesi vesilaitoksella rutiinitutkimuksessa ja vesijohtovesi	1 x 50 ml ja 5 x 10 ml tai 10 x 10 ml
Yksityistalouksien vesi ja kotieläinten juomavesi	1 x 50 ml, 5 x 10 ml, 5 x 1 ml, 5 x 0,1 ml (tai 10 x 10 ml)
Uimarantavesi	(5 x 10 ml), 5 x 1 ml, 5 x 0,1 ml, 5 x 0,01 ml
Raakavesi	5 x 10 ml, 5 x 1 ml, 5 x 0,1 ml, 5 x 0,01 ml
Jätevesi	5 x 1 ml, 5 x 0,1 ml, 5 x 0,01 ml jne.

¹⁾ Katso Opastavia tietoja, turvallisuusohjeet.

9.2 Rikastusviljely

Siirrä bromikresolipurppura-laktoosi-liemiputket lämpötilaan $35 \pm 1^\circ\text{C}$ tai $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Hylkää putket, jotka osoittavat kaasunmuodostusta tai kasvua ennen siirrostusta. Millilitraa suuremmat näyte-erät tulee lisätä näyte-erän kokoiseen tilavuuteen väkevyydeltään kaksinkertaista kasvualustaa. Kvantitatiivisen tuloksen saamiseksi käytetään MPN-menetelmää (standardi SFS 4447).

Kaikki putket, joissa havaitaan hapon ja kaasun muodostusta inkuboinnin jälkeen lämpötilassa $35 \pm 1^\circ\text{C}$ tai $37 \pm 1^\circ\text{C}$, tulkitaan positiivisiksi. Kaasunmuodostus saadaan joskus esiin vasta kevyesti putkea napauttamalla, jolloin kuplat nousevat ylös. Kaasunmuodostus tulkitaan positiiviseksi, kun kaasu täyttää vähintään kaasun keräysputken kupolin. Hapon muodostus havaitaan liuoksen muuttumisena keltaiseksi. Tuloksen voi alustavasti tarkistaa jo 24 tunnin kuluttua, mutta lopullinen tulos rikastusviljelystä saadaan vasta 44 ± 4 tunnin kuluttua. Kunkin laimennustason kaikkien putkien reaktiot merkitään muistiin.

9.3 Tarkistusviljely

Tarkista jokainen positiivinen rikastustulos ja joitakin kasvua osoittavia negatiivisia putkia sellaisesta laimennoksesta, jossa jossakin putkessa on positiivinen tulos. Tarkistusviljely tehdään briljanttivihreäsappi -liemessä (7.2.2).

Tarkistus briljanttivihreä-sappi -liemessä

Rikastusviljelyputkista (9.2) siirrostetaan steriilillä pipetillä 2 tippaa tai $100\ \mu\text{l}$ viljelmää vastaavaan briljanttivihreä-sappi -liemiputkeen. Putkia inkuboidaan lämpötilassa $35 \pm 1^\circ\text{C}$ tai $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Kaasunmuodostus 44 ± 4 tunnin kuluessa on positiivinen tulos. Alustavasti putket voi tarkastaa jo 22 ± 2 tunnin kuluttua. Kunkin laimennustason kaikkien putkien reaktiot merkitään muistiin.

9.4 Lämpökestoiset koliformiset bakteerit

Samoin kuin tarkistusviljelystä (9.3) lämpökestoisten koliformisten bakteerien ja alustavan **E. colin** määrittämisessä lähdetään rikastusviljelyn putkista tai pulloista ja testattavat viljelmät valitaan saman periaatteen mukaan (9.3).

Rikastusviljelyputkista (9.3) siirrostetaan 2 tippaa tai $100\ \mu\text{l}$ steriilillä pipetillä steriileihin lauryyli-tryptooni-mannitoli-tryptofaaniliemiputkiin (7.2.4). Siirrostetut putket asetetaan lämpötilaan $44,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ vesihauteeseen, josta ne voidaan haluttaessa kahden tunnin kuluttua siirtää inkubointikaappiin samaan lämpötilaan. 22 ± 2 tunnin kuluttua luetaan positiiviseksi tulokseksi kaasun muodostus. Tulos merkitään muistiin siten, että se voidaan yhdistää vastaavan viljelmän rikastus- ja tarkistusviljelyiden tulosten kanssa.

9.5 E. colin alustava osoitus

Alustavassa **E. colin** osoituksessa indolin muodostus tutkitaan samanaikaisesti lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrittäksen kanssa lisäämällä indolireagenssia lauryyli-

tryptooni-mannitoli-tryptofaaniliemiputkiin. Alustavasti **E. coliksi** katsotaan lämpökestoiset indoliposiitiiviset koliformiset bakteerit.

9.5.1 Indolikoe

Haluttaessa indolitestit voidaan tehdä vain niille kannoille, jotka ovat olleet positiivisia muissa testeissä.

Heti, kun on luettu kaasun muodostus lauryyli-tryptooni-mannitoli-tryptofaaniliemiputkista, kuhunkin putkeen lisätään $0,2 \dots 0,3\ \text{ml}$ indolireagenssia ja tulos luetaan heti. Jos se on negatiivinen, tulos tarkistetaan 10 min kuluttua. Positiivinen tulos on tummanpunainen väri ylemmässä amyylialkoholikerroksessa. Jos reagenssin väri ei muutu tulos on negatiivinen.

Testin toimivuus voidaan varmistaa indoli-positiivisen ja -negatiivisen tunnetun kannan avulla.

Indolitestin tulos merkitään muistiin siten, että se voidaan yhdistää vastaavan viljelmän rikastus-, tarkistus- ja lämpökestoisuusviljelyiden tulosten kanssa.

10 TULOSTEN LASKEMINEN

MPN-menetelmän tulosten laskeminen on esitetty standardissa SFS 4447. Rikastusviljelyn tulos ei ole riittävän luotettava koliformisten bakteerien lukumäärän mitta, vaan tuloksena ilmoitetaan tarkistusviljelyn (9.2) tulos. Lämpökestoisten koliformisten bakteerien lukumäärä lasketaan ottamalla huomioon vain ne viljelmät, jotka antavat positiivisen tuloksen lämpökestoisuudessa (9.3). Alustavan **E. colin** lukumäärä lasketaan ottamalla huomioon ne koliformiset bakteerit, jotka ovat lisäksi lämpökestoisia ja muodostavat indolia tryptofaanista (ks. Opastavia tietoja).

11 TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Tulosta ilmoitettaessa on viitattava tähän standardiin. Kaikki tiedot näytteen täydellistä tunnistusta varten on ilmoitettava. Tulokset ilmoitetaan erikseen koliformisille bakteereille, lämpökestoisille koliformisille bakteereille ja alustavalle **E. colille**.

SFS 4089 Suomen Standardisoimislautakunta 1988-04-18

OPASTAVIA TIETOJA

Tämän standardin mukaan lämpökestoiset koliformiset bakteerit tuottavat kaasua lämpötilassa $44,5^\circ\text{C}$, kun taas standardissa SFS 4088 lämpökestoiseksi koliformiseksi bakteeriksi luokitellaan tässä lämpötilassa kasvavat ja happoa muodostavat pesäkkeet. Osa indolia lämpötilassa $44,5^\circ\text{C}$ muodostavista bakteeriviljelmistä, jotka eivät muodosta kaasua lämpötilassa $44,5^\circ\text{C}$ vuorokaudessa saattavat kuitenkin olla **E. coli** -kantoja (5).

Turvallisuusohjeet

p-dimetylaminoobentsaldehydi, amyylialkoholi ja väkevä suolahappo ovat sosiaali- ja terveysministeriön päätöksen (409/78) mukaan terveydelle vaarallisia aineita.

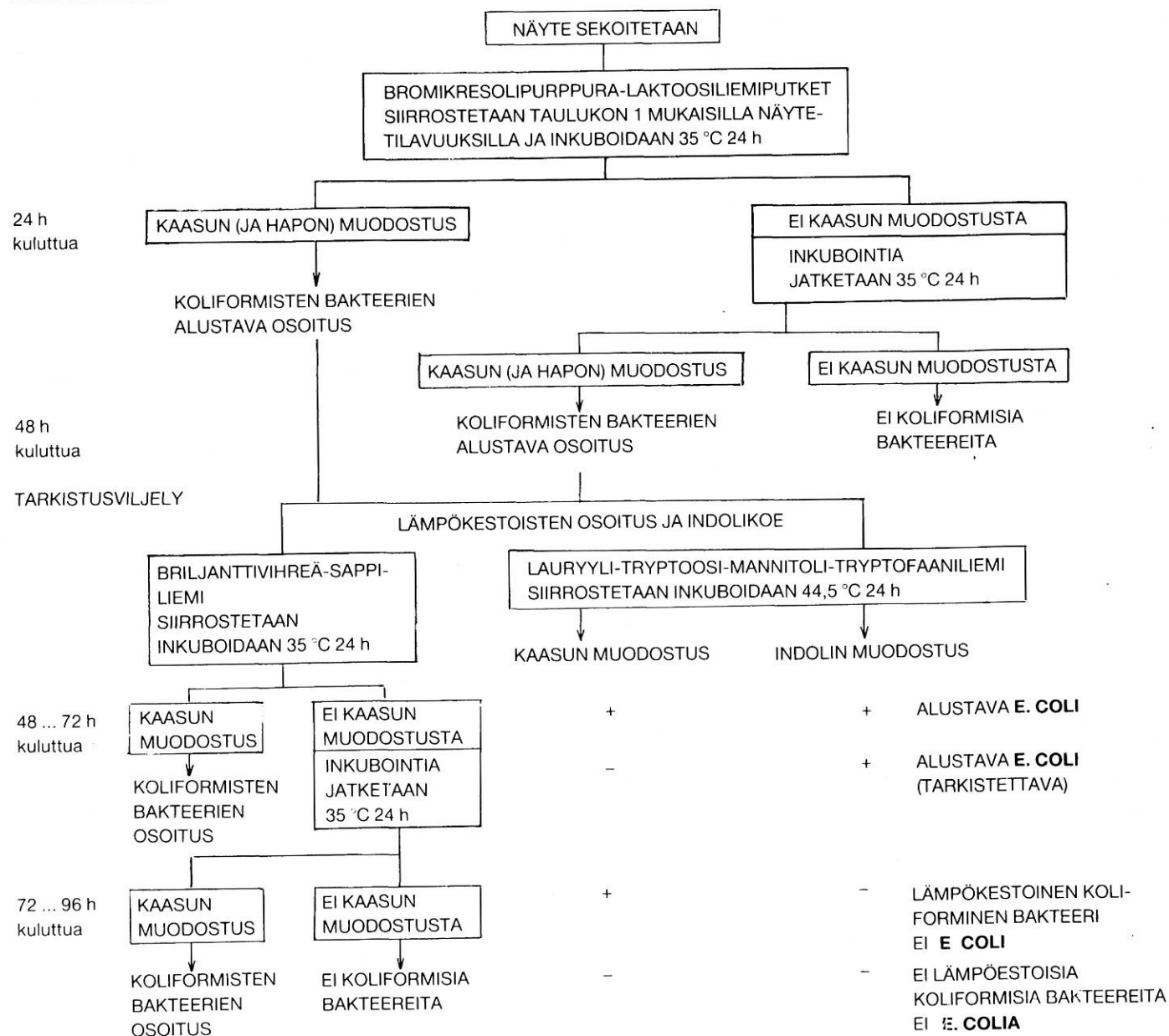
p-dimetylaminoobentsaldehydin joutumista iholle on vältettävä. Sitä käsitellään mieluiten vetokaapissa suojakäsineitä käyttäen.

Amyylialkoholi ärsyttää limakalvoja ja unettaa suurina määrinä. Sitä tulee käsitellä vetokaapissa.

Väkevä suolahappo on ärsyttävä ja syövyttävä. Sitä on käsiteltävä vetokaapissa käyttäen tarpeen mukaan suojakäsineitä, hengitys- ja silmäsuojaimia.

Lähdekirjallisuutta

- 1 Talousveden terveydelliset riskitekijät. 1985. Lääkintöhallituksen julkaisuja n:o 68. Helsinki.
- 2 Juoma- ja talousveden tutkimusmenetelmät. 1969. Elintarviketutkijain seura r.y. 169 s. Helsinki.
- 3 Joint Committee of the Public Health Laboratory Service and Standing Committee of Analysts 1980. Single tube confirmatory tests for *Escherichia coli*. J. Hyg., Camb. 85: 51 – 57.
- 4 Standard methods for the examination of water and wastewater, 1981. 15. painos. 1134 p.
- 5 Bueschgens, D.H. & M.E. Stiles 1984. *Escherichia coli* variants for gas and indole production at elevated incubation temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 48: 601 – 605.

RIKASTUSVILJELY

Kuvio 1 Koliformisten bakteerien, lämpökestoisten koliformisten bakteerien ja *E. coli* (alustava) tutkiminen