

# Petrifilm™ som alternativt medium for dyrking av bakterier i vann

Olav Rosef, Arvid Odland og Dag Bjerketvedt  
Høgskolen i Telemark  
Institutt for natur-, helse og miljøvern  
3800 BØ I TELEMARK  
e-post: olav.rosef@hit.no

Key words: water analysis, enumeration of microorganisms, Petrifilm, methods

Metoden NS-EN ISO standard 6222 er sammenlignet med Petrifilm for påvisning og telling av mikroorganismer i overflatevann (råvann) og i drikkevann (behandlet vann). De dyrkingstemperaturene som gjeldende drikkevannsforskrift angir for kimtall, 22 °C og 36 °C, er brukt. Petrifilm for kimtall ga distinkte og lett tellbare røde kolonier. Bakteriene hadde en tendens til å sverme på kimtallsagaren (sammenflytende vekst) i prøvene fra overflatevann. Ingen sverming av bakteriene ble observert på Petrifilm. Sverming umuliggjorde avlesningen på kimtallsagaren. Det var signifikante forskjeller i kimtallet på Petrifilm og kimtallsagar ved dyrking av overflatevann ved 22 °C og ved 36 °C avlest etter 48 timer ( $n=65$ ,  $p<0,05$ ). Kimtallsagar ga høyere kimtall enn Petrifilm. Det var ingen signifikant forskjell i antall kolonier på kimtallsagar og Petrifilm ved dyrking av drikkevann. Petrifilm kan være et godt og enkelt alternativ til tradisjonelle kimtallsanalyser i vann. Petrifilm Select *E. coli*, som er beregnet til påvisning av *Escherichia coli* i næringsmidler, ble sammenlignet med m-FC agar som angitt i Norsk Standard 4792. Det var ikke signifikant forskjell mellom Petrifilm Select *E. coli* og m-FC agar ( $n=35$ ,  $p=0,36$ ) i påvisningen av *E. coli*. Petrifilm er enkel å bruke, lett å lese av, og ga ingen fortolkningsproblemer av koloniene. Petrifilm krever liten plass, de gir mindre avfall og er tidsbesparende i bruk sammenlignet med de tradisjonelle metodene.

## Innledning

I Norge utføres mange tusen mikrobiologiske vannanalyser for å dokumentere drikkevannskvaliteten. Den metoden som i årtier har vært brukt til kimtallsanalyser, Norsk Standard 4791 (1), er nå erstattet av NS-EN ISO 6222 (2). For undersøkelse av koliforme og termotolerante koliforme bakterier brukes henholdsvis Norsk Standard 4788 (3) og Norsk Standard 4792 (4). Drikkevannsforskriften (5) setter krav til mikrobiologiske analyser av drikkevann og beskriver både omfanget av prøver og anvendelse av dyrkingstemperatur. Den reviderte forskriften (5) gjeldende fra 01.01.02 beskriver spesifikke metoder for drikkevannanalysene. Disse skal anvendes når forvaltningsvedtak skal gjøres. Industrien og vannverkseier står friere i valg av metoder for egenkontrollanalyser. Det er da opp til brukerne å velge en kvalitativ god metode til lavest mulig kostnad.

Fremstilling av standard vekstmedier for kimtall krever innveining, autoklaving (sterilisering) og nedkjøling før bakteriene støpes inn i næringsagaren. Dette er arbeidskrevende og forutsetter nøye kontroll av tillaging av medier og agartemperaturen før den brukes til innstøping. For fremstilling av medier til bruk for påvisning av koliforme og termotolerante koliforme bakterier trengs påpasselig oppvarming av mediet og tilsetning av lite holdbar rosolsyre oppløsning (m-FC agar). Petrifilm er derimot ferdig til bruk, kommersielt tilgjengelige og har lang holdbarhet. Petrifilm som metode til bakteriologisk kontroll av næringsmidler er godkjent av offisielle valideringsorganer som AOAC (6) (metode 73,242, 1990 for kimtall) og NMKL metodene 147 og 146 (7, 8) for henholdsvis koliforme bakterier, *Escherichia coli* og kimtall. Utover en semesteroppgave på Høgskolen i Telemark (9) har ingen beskrevet en sammenligning i bruk av tradisjonelle metoder og Petrifilm for kimtallsanalyser av vann. Hensikten med denne undersøkelsen har vært å vurdere om Petrifilm kan være et aktuelt alternativ til de tradisjonelle kimtallsmetodene.

Det har vært brukt Petrifilm for påvisning av koliforme bakterier og *E. coli* (Petrifilm 0604) i vann, men med ulikt resultat (9, 10, 11). Fersk fekal forurensning i drikkevann uttrykkes best ved påvisning av indikatorbakterien *E. coli*. Nylig har Petrifilm Select *E. coli*, som er beregnet for påvisning av *E. coli* i næringsmidler, kommet på markedet. Hensikten med vår studie var å undersøke om denne filmen kan gi raske og sikre analyser for påvisning av *E. coli* i vann.

## Materiale og metoder

Til drikkevannsanalysene ble det tatt ut 40 prøver fra forskjellige tappesteder til Bø vannverk. Fra Bø-elvas øvre del ble det tatt ut 65 prøver av overflatevann fra tre lokaliteter til kimtallsanalyser og 35 prøver for undersøkelse av *E. coli*. Én liter vann ble tatt ut på sterile glassflasker og brakt til laboratoriet og undersøkt innen en time. Prøveflaskene ble rystet kraftig i cirka 1 minutt før ut-

sæd. For kimtallsanalysene ble fem paralleller tatt ut. Plastlokket på Petrifilm ble løftet opp, 1 ml prøve ble avsatt på filmen, og deretter ble lokket lagt på. Ett lett trykk med en spesialbrakett plassert over prøven fordelte vannprøven på filmen.

Ved de tradisjonelle kimtallsanalysene ble 1 ml av prøven brakt over i en petriskål og tilsatt cirka 15 ml næringsagar (Peptongjærekstrakt agar, PGA) som var nedkjølt til 45 °C. Forsiktlige åttetallsbevegelser ble benyttet for å få en jevn fordeling av prøvene. Lokket ble satt på skålene når næringsagaren var stivnet. For å få samme inkubasjonsbetingelser ble prøvene samtidig satt inn for inkubering og samtidig tatt ut av inkubatoren for avlesning. Prø-

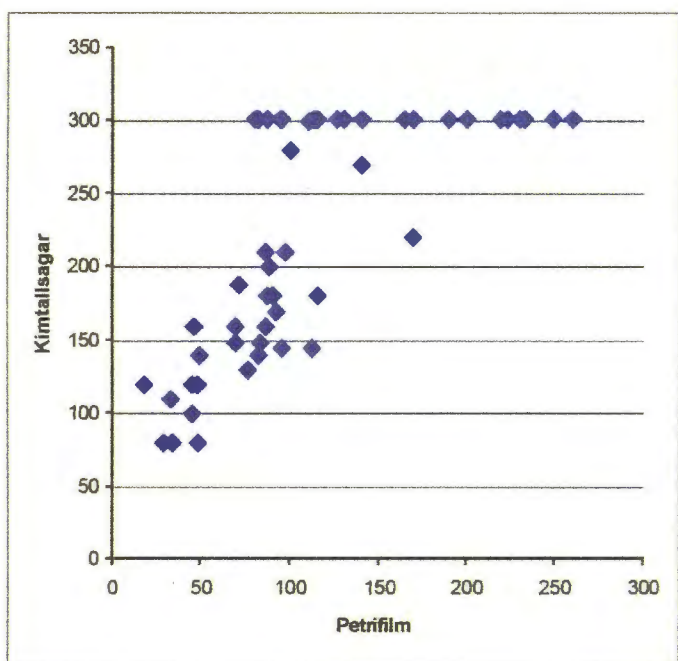
vene av drikkevann og overflatevann ble dyrket ved 22±1 °C. Prøvene ble avlest etter 24, 48 og 72 timers dyrkingstid, mens det ved dyrking ved 36±1°C ble lest av etter 24 og 48 timer. Det ble talt inntil 300 kolonier. Koloniantall større enn 300 ble angitt som 301. Kimtallsskålene som var umulige å telle på grunn av sverming, ble tatt ut av undersøkelsen.

For å påvise termotolerante koliforme bakterier og presumptiv *E. coli* ble m-FC agar beskrevet i NS 4792 (4) benyttet og sammenlignet med Petrifilm Select *E. coli*. Noen minutter før Petrifilm skulle brukes, ble 1 ml sterilt vann tilført filmen i dyrkingsfeltet for at agaren i filmen skulle svulle. En spesiell brakett ble brukt til å fordele prøven på dyrkingsområdet. Hundre ml vann ble filtrert gjennom et Millipore membranfilter (Cat. No. HAWG047S1) med porestørrelse 0,45 µm. Ett filter ble lagt på m-FC agaren med rutenettet opp, og tilsvarende ble lagt på Petrifilm Select *E. coli*. Disse ble dyrket ved 44±1 °C og avlest etter 24 timer. For å vurdere om det var signifikante forskjeller i påvisning av antall bakterier mellom metodene ble Mann-Whitney U-test benyttet. Plott som viser forholdet mellom antall kolonier på kimtallsagar og Petrifilm, ble laget med programmet EXCEL.

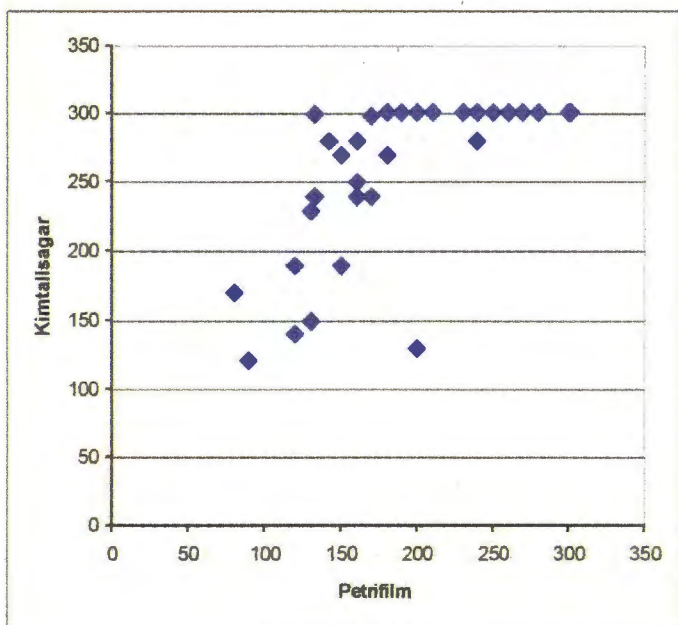
### Resultater

Det ble ikke dannet synlige kolonier etter dyrking ved 22 °C i 24 timer. De statistiske analysene viste at det ikke var signifikante forskjeller i påvisning av bakterier i drikkevann med bruk av Petrifilm og kimtallsagar dyrket ved 22 °C i 48 timer og 72 timer (n=40, p=0,055 og 0,62) og ved 36 °C dyrket i 24 timer og 48 timer (n=40, p=0,70 og 0,96). Det var lave verdier både på Petrifilm og kimtallsagar (0-4 kolonier) fra drikkevann. Dyrking ved 36 °C i 48 timer ga imidlertid i enkelte tilfeller cirka 30 kolonier på kimtallsagaren og ingen på Petrifilm. Noen prøver ga imidlertid verdier på 4-12 på Petrifilm og fra ingen til én koloni på kimtallsagaren. Ved analyser av overflatevann ble det påvist høyere antall bakterier på kimtallsagaren enn på Petrifilm dyrket ved 22 °C i 48 timer og 72 timer som vist ved plottene i Figur 1 og Figur 2. Statistiske analyser viste signifikante forskjeller (n=65, p<0,0001 og p=0,0001). Dyrking ved 36 °C ga også høyere kimtall på kimtallsagar enn på Petrifilm som vist i Figur 3 og Figur 4. Det var imidlertid ikke signifikante forskjeller i antallet etter 24 timers dyrking (n=65, p=0,51), men etter 48 timers dyrking (n=40, p=0,0199).

Bakteriene svermet ikke ved vekst på Petrifilm i motsetning til på kimtallsagaren (Tabell 1). Tendensen til sverming var størst ved dyrking ved 36 °C. Figur 6 viser de distinkte lett avlesbare koloniene på Petrifilm. Figur 5 viser et høyere antall bakterier ved dyrking på m-FC agar i forhold til Petrifilm Select *E. coli*. Forskjellen var ikke signifikant (n=35, p=0,36). Figur 7 viser entydige, lett avlesbare kolonier på Petrifilm Select *E. coli* i motsetning til på m-FC agaren, som ga ulike typer kolonier.



Figur 1. Forholdet mellom antall bakteriekolonier på kimtallsagar og Petrifilm i overflatevann dyrket ved 22 °C i 48 timer.



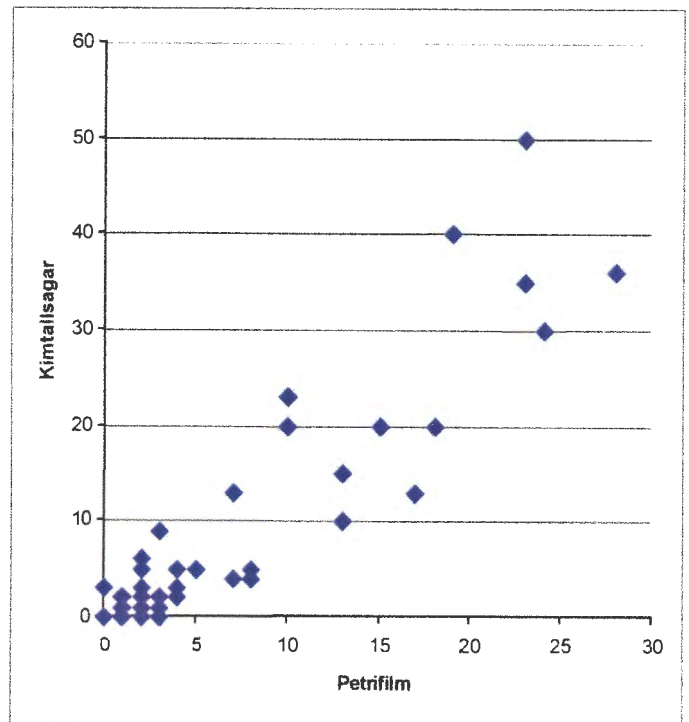
Figur 2. Forholdet mellom antall bakteriekolonier på kimtallsagar og Petrifilm i overflatevann dyrket ved 22 °C i 72 timer.

## Diskusjon

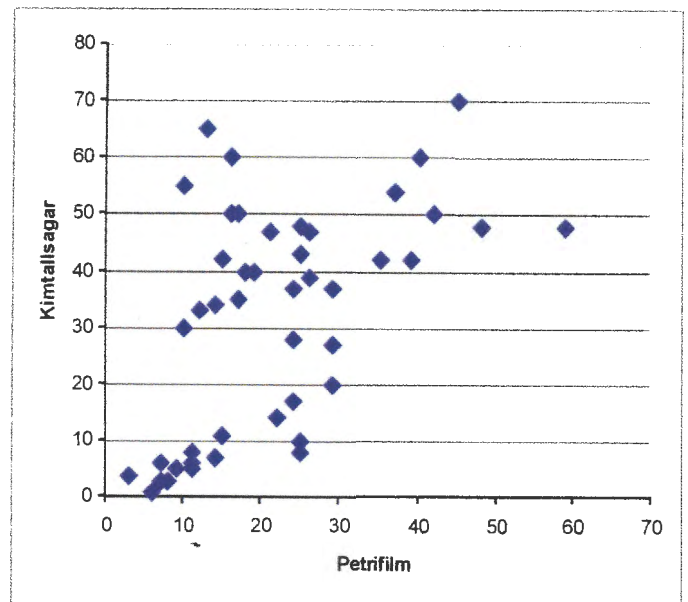
Drikkevann skal ikke være kontaminert med fekale bakterier og skal sikres med to hygieniske barrierer som beskrevet i drikkevannsforskriften (5). Vi har i denne undersøkelsen valgt overflatevann fra Bø-elva, som har en variabel mikrobiologisk kvalitet. Elva brukes som råvannskilde til drikkevann og renner ut i Norsjø, som brukes som drikkevannskilde for en større del av befolkningen i Grenland. I Bø-elva overskrider kimtallet og antall indikatorbakterier oftest kravene satt i drikkevannsforskriften (5). Tidligere undersøkelser har påvist potensielt patogene mikroorganismer i elvas øvre del selv om *E. coli* ikke kunne påvises (12).

Bruk av Petrifilm er kostnadsbesparende i forhold til tradisjonelle metoder når arbeidskostnadene er tatt med (13). Kostnadsforskjellene avhenger av antall analyser og hvordan laboratorierutinene er lagt opp. Petrifilm kan brukes direkte uten vesentlig forarbeid og noen form for medietillaging. En rekke sammenlignende undersøkelser av Petrifilm og tradisjonelle metoder er gjennomført, og metodene er funnet likeverdige når det gjelder påvisning av bakterier i næringsmidler. Flere laboratorier utfører akkrediterte analyser etter Petrifilm metodene (Norsk Akkreditering). Valideringer av Petrifilm har gitt AOAC (Association of Official Analytical Chemists) godkjenning (6).

Det kan tilsettes til 2,3,5-trifenyltetrazolimidklorid (TTC) til kimtallsagar for å gi distinkte røde kolonier. En reduksjon av stoffet ved bakterievekst gir rødfargede kolonier som på Petrifilm. Det er imidlertid ikke angitt en slik tilsetning i mediene i Norsk Standard 4791 (1) eller ISO standard 6222 (2). TTC virker hemmende på enkelte bakterier, mens andre bakterier som for eksempel intestinale enterokokker er robuste. I våre analyser fra overflatevann var sverming på kimtallsagaren et problem som gjorde at skålene var vanskelige eller umulige å tolke (Tabell 1). Tilsetningen av TTC i Petrifilm kan være en medvirkende årsak til at det ikke var sverming, og at en fikk signifikante forskjeller på resultatene i overflatevannet sammenlignet med kimtallsagar.



Figur 3. Forholdet mellom antall kolonier på kimtallsagar og Petrifilm i overflatevann dyrket ved 36 °C i 24 timer.

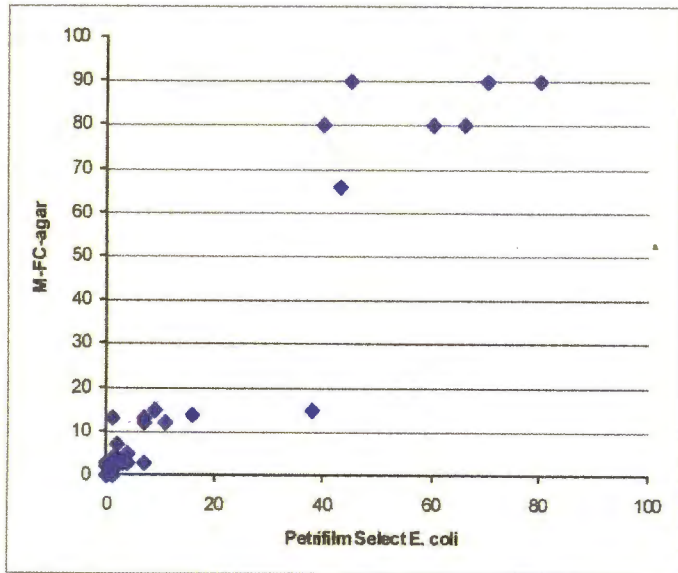


Figur 4. Forholdet mellom antall kolonier på kimtallsagar og Petrifilm i overflatevann ved 36 °C i 48 timer.

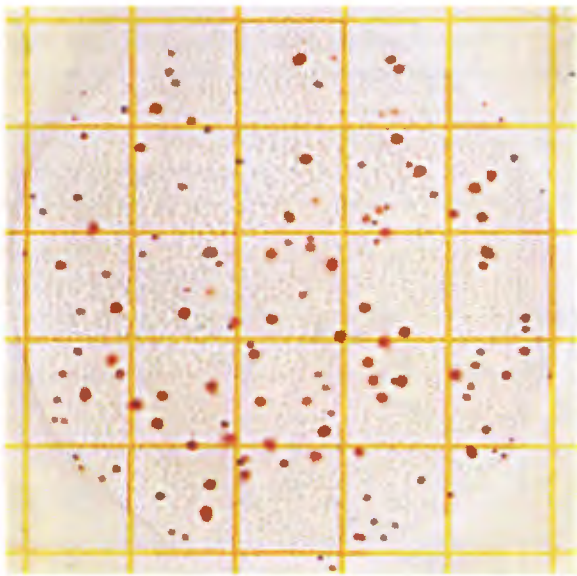
Tabell 1. Antall (%) prøver med sverming på kimtallsmediet og Petrifilm etter dyrking ved 22 °C i 48 timer og 72 timer og ved 36 °C dyrket i 24 timer, 48 timer og 72 timer.

	n	Petrifilm 22 °C		Petrifilm 36 °C		Kimtall 22 °C		Kimtall 36 °C				
		48 t	72 t	24 t	48 t	72 t	48 t	72 t	24 t	48 t	72 t	
Vann												
Overflatevann	65	0	0	0	0	0	2 (3,1%)	5 (7,7%)	6 (9,2%)	11 (17,0%)	21 (32,3%)	
Drikkevann	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

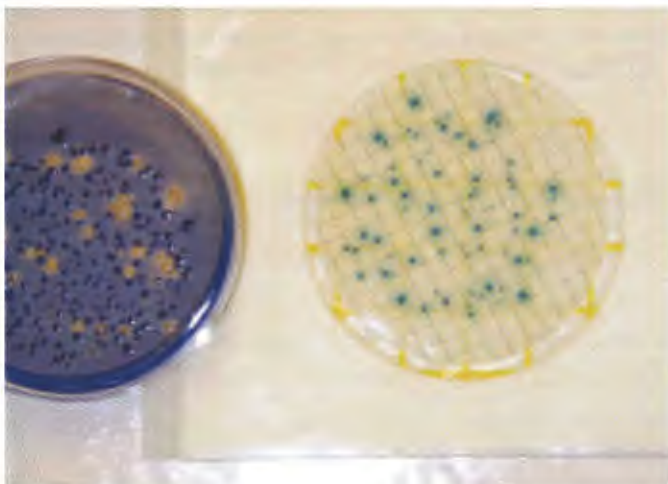




Figur 5. Forholdet mellom antall *E. coli* kolonier på Petrifilm Select *E. coli* og m-FC-agar.



Figur 6. Petrifilm for kimtall ved dyrking av 1 ml overflatevann.



Figur 7. Dyrking av 100 ml vannfiltrat på Petrifilm Select *E. coli* og m-FC agar.

Utsæd på Petrifilm er enkel og krever liten trening og erfaring. Da Petrifilm er lett å lese av og gir distinkte røde kolonier, vil en ikke øvet person lett kunne lære seg avlesning av disse (Figur 6). I Norsk Standard (1) er det ikke beskrevet bruk av parallelle analyser, mens det i den forrige utgave av ISO standard 6222 var krav til parallelle analyser. Det er uklart om det er krav til parallelle analyser i gjeldende NS-ISO 6222 (2). Ved bruk av fem paralleller greide vi til en viss grad å eliminere problemet (sverming) med avlesning av kimtallsagaren fra overflatevann. Overflatevannet hadde et kimtall som i denne undersøkelsen ofte oversteg 300 per ml. Risikoen for at en del av disse når overflaten ved innstøpingen er derfor stor i motsetning til i drikkevann hvor bare få mikrober per ml var til stede. Kimtallsanalyser med tradisjonelle metoder ga derfor usikre resultater av overflatevann, fordi flere skåler var ulesbare på grunn av sverming og måtte forkastes. Når Petrifilm brukes for analyser av næringsmidler, angis antall kolonier som vokser frem ved 30 °C etter 72 timer (NMKL 146) (8), mens vi i denne undersøkelsen har brukt temperaturene 22 °C og 36 °C, som er angitt i drikkevannsforskriften (5). Kimtallsanalysene av drikkevann ga ingen signifikant forskjell mellom resultatene. Fra overflatevann var det imidlertid signifikante forskjeller i påvisning av bakteriene mellom metodene ved dyrking ved 22 °C, men ikke ved 36 °C etter 48 timer. Krav om kimtallsanalyser av overflatevann dyrket ved 36 °C (37 °C) er imidlertid tatt ut av den reviderte drikkevannsforskriften (5) og vil derfor ikke ha noen praktisk betydning ved vurderinger av vannkvaliteten. Selv om det er forskjeller i påvisning av bakterier mellom kimtallsagar og Petrifilm, vil sistnevnte likevel være et nyttig redskap for enkle og raske mikrobiologiske vannanalyser. Bruk av Petrifilm kan forenkle egenkontrollen for industri og vannverk, siden det kreves lite utstyr for å utføre analysene.

Påvisning av fersk fekal forurensning uttrykkes best ved indikatorbakterien *E. coli*. Det skal i henhold til drikkevannsforskriften (5) reageres umiddelbart når fersk fekal forurensning påvises i drikkevann. I overvåkingsammenheng er det viktig å avdekke fekal forurensning så raskt som mulig. Det er nødvendig å ha en enkel og rask metode hvor det kan tas et større antall prøver med minst mulig bruk av ressurser. Påvisning av termotolerante koliforme bakterier og presumptiv *E. coli* basert på membranfiltrering er beskrevet i NS 4792 (4). Metoden krever imidlertid en arbeids- og tidkrevende verifiseringsprosedyre. Det er også holdbarhetsbegrensninger på tillagde medier. Petrifilm Select *E. coli* verifiserer direkte *E. coli* ved at det påvises produksjon av  $\beta$ -glucuronidase, som gir grønne til blå-grønne kolonier (Figur 7). Øvrige koliforme og andre bakterier blir fargeløse og leses dermed ikke av. Mange kolonier på m-FC-agaren var "atypiske" og ga kolonier med forskjellige fargenyanser (Figur 7). Dette er imidlertid et vanlig bilde i kontaminert råvann. Det var ingen signifikant forskjell mellom Petri-

film Select *E. coli* og m-FC agar ved påvisning av *E. coli*. Petrifilm ga kolonier med noe ulik størrelse, men alle koloniene var distinkte blågrønne og enkle å lese av. Få har gjort undersøkelser med Petrifilm for å påvise *E. coli* i vann. Den sveitsiske hæren har gjort undersøkelser med bruk av Petrifilm 0604 for å påvise koliforme bakterier og *E. coli* i vann. De konkluderte med at metoden var godt egnet for vannanalyser (10). Så langt har ingen testet Petrifilm Select *E. coli* for direkte påvisning av *E. coli* i vann.

I drikkevannsforskriften (5) er *E. coli* innarbeidet som en parameter til erstatning for termotolerante koliforme bakterier og presumptiv *E. coli*. Forskriften legger opp til bruk av standardmetoder. Disse metodene skal implementeres i overvåking og kontroll for forvaltningen. Vi finner det imidlertid underlig at en foreslår spesielle definerte metoder i vannforskriften når en kjenner til utviklingen i hurtigdiagnostisering og arbeider som foregår med å forbedre metodene for mikrobiologiske vannanalyser. Det medfører derfor en byråkratisk revisjon av forskriften om en metode skal kunne anvendes for offentlig kontroll.

Vannverkseier og industrien har behov for løpende kontroll for raskest mulig å få svar på vannkvaliteten. De vil ha nytte av metoder som Petrifilm hvor en sparer arbeid og utstyr som er nødvendig for å utføre de tradisjonelle metodene.

Konklusjonene som kan trekkes, er at Petrifilm til kimtallsanalyser og til påvisning av *E. coli* ved hjelp av membranfiltreringsteknikk i drikkevann er et godt alternativ til de tradisjonelle metodene. Petrifilm er raskere å ta i bruk da den ikke krever noen tillaging; de er lette å lese av og er rimelig i bruk. Det er enklere å lære å bruke Petrifilm enn de konvensjonelle metodene. Bruk av Petrifilm krever små investeringer på laboratoriet.

## Etterord

Takk til Ragnhild Li for utmerket teknisk assistanse.

## Summary

### PETRIFILM™ AS AN ALTERNATIVE METHOD TO DETECT BACTERIA FROM WATER

NS-EN ISO standard 6222 was compared with Petrifilm for the detection and enumeration of microorganisms in surface water and treated tap water. The incubation temperatures used for total counts were 22 °C and 36 °C. The growth on Petrifilm gave distinct, easy-to-read red colonies on the total count film. The bacteria gave swarming on total count agar sampled from surface water in 3.1 % and 7.7 % of the samples grown at 22 °C for 48 and 72 hours, respectively. The total count plates were impossible to read. Growth at 36 °C resulted in comparable percentages of 9.2 % and 17 % after 24 and 48 hours, respectively. No swarming was seen on Petrifilm. There were statistically significant differences between numbers counted on Petrifilm and total count agar from surfa-

ce water grown at 22 °C for 48 hours (n=65, p<0.001) and 72 hours (n=65, p=0.001) and grown at 36 °C for 48 hours (n=65, p=0.0199). There was no significant difference between bacteria counted on total count agar and Petrifilm grown from treated tap-water. The difference between the different growth media was of little practical significance. Petrifilm should therefore be a suitable alternative to the traditional methods. Fresh faecal contamination can best be expressed by the occurrence of the index bacteria *Escherichia coli*. Petrifilm Select *E. coli* and m-FC agar as described in NS 4792 were used to compare the detection of *E. coli* grown at 44 °C. Petrifilm Select *E. coli* was easy to use and gave distinct colonies compared to m-FC agar. There was no significant difference between the two methods with respect to detecting *E. coli* (n=35, p=0.36). Petrifilm requires little space, gives less waste and is less time consuming than traditional methods, and therefore should be a good alternative.

## Referanser

1. Norsk Standard NS 4791. Vannundersøkelse. Heterotroft kimtall. Innstøpningsmetode. 1. utg. mai 1990. Norges Standardiseringsforbund (NSF), Oslo.
2. Norsk Standard NS-EN ISO 6222. Vannundersøkelse. Bestemmelse av dyrkbare mikroorganismer (kimtall). Kolonitelling ved innstøping i næringsagarmedium. 1. utg. september 1999. Norges Standardiseringsforbund (NSF), Oslo.
3. Norsk Standard NS 4788. Vannundersøkelse. Koliforme bakterier. Membranfiltermetode. 1. utg. mai 1990. Norges Standardiseringsforbund (NSF), Oslo.
4. Norsk Standard NS 4792. Vannundersøkelse. Termotolerante koliforme bakterier og presumptiv *E. coli*. Membranfiltermetode. 1. utg. mai 1990. Norges Standardiseringsforbund (NSF), Oslo.
5. Forskrift om vannforsyning og drikkevann. Sosial- og helsedepartementet. 1. jan 1995, endret 01.01.2002. Helsedepartementet, FOR 2001-12-04 nr 1372.
6. AOAC official method 990.12. Aerobic plate count in foods. Dry rehydratable film (Petrifilm aerobic count plate) method. First action 1990. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International, 1995: ch. 17.2.07.
7. Nordisk Metodikommitté för Livsmedel (NMKL) 147. Koliforme bakterier og *Escherichia coli* i næringsmidler. Bestemt ved Petrifilm™. 1993.
8. Nordisk Metodikommitté för Livsmedel (NMKL) 146. Aerobe mikroorganismer. Antall ved 30 °C. Bestemmelse i næringsmidler ved Petrifilm™. 1993.
9. Bratsvedal M, Vold H. Sammenligning av tradisjonelle mikrobiologiske metoder og Petrifilm™ for påvisning av bakterier i vann. 1999. Bø, Høgskolen i Telemark: 1999. Hovedoppgave.
10. Bühler HP, Lüthi T, Spühler A. Mikrobiologische Beurteilung von Trinkwasser: Modifizierte Anwendung des 3M-Petrifilm-Systems unter Feldbedingungen. Schweiz Z Milit Med 1993; 70: 9-12.
11. Baumgartner A, Grand M, Simmen A. Quantitative Bestimmungen von *E. coli* in Wasserproben-Vergleich von ECD-Agar und Petrifilm™. Mitt Geb Lebensm Unters Hyg 1993; 84: 382-7.
12. Rosef O, Rettedal G, Lågeide L. Thermophilic campylobacters in surface water: a potential risk of campylobacteriosis. Int J Environ Health Res 2001; 11: 321-7.
13. Chain VS, Fung D. Comparison of Redigel, Petrifilm, Spiral Plate System, Isogrid, and aerobic plate count for determining the numbers of aerobic bacteria in selected foods. J Food Prot 1991; 54: 208-11.