

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING
Nasjonalt referanselaboratorium for vannanalyser

O-8101201

SAMMENLIGNING OG TILPASNING AV METODER
Bakteriologiske metoder i bruk i Norge

2 . oktober 1981

Saksbehandler:	Kari Ormerod
Medarbeider:	<i>Gunnar Langeland, Norges veterinær- høgskole</i>
Leder for referanse- aktivitetene:	Ingvar Dahl
For administrasjonen:	J.E. Samdal Lars N. Overrein

NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Forskningsråd

Postadresse:
Postboks 333, Blindern
Oslo 3

Brekke 23 52 80
Gaustadalleen 46 69 60
Kjeller 71 47 59

Rennortnummer:
O-81012-01

Undernummer:
II

Løpenummer:
1320

Begrenset distribusjon:

Rapportens tittel: SAMMENLIGNING OG TILPASNING AV METODER Bakteriologiske metoder i bruk i Norge	Dato: 2.10.1981
	Prosjektnummer: 8101201
Forfatter(e): Ormerod, Kari	Faggruppe: ANABIO
	Geografisk område:
	Antall sider (inkl. bilag): 31

Oppdragsgiver: Statens forurensningstilsyn	Oppdragsg. ref. (evt. NTNF-nr.):
---	----------------------------------

Ekstrakt:

Som en del av det internordiske standardiseringsarbeid er det i Norge foretatt en rundspørring om hvilke bakteriologiske metoder som brukes for vann og kloakkslam. Mange metoder er i bruk, og det er store variasjoner i utførelse innen alle metodene. Effekten av variasjonene er diskutert og forslag til standard metoder fremlagt.

4 emneord, norske:
1. Analysemetoder
2. Bakteriologi
3. Vann
4. Kloakkslam

4 emneord, engelske:
1. Methods of analysis
2. Bacteriology
3. Water
4. Sewage sludge

Prosjektleder:

Kari Ormerod

Seksjonsleder:

For administrasjonen:

[Signature]
[Signature]

ISBN 82-577-0421-0

INNHOOLD

	Side
FORORD	3
1. INNLEDNING	4
2. PARAMETRENE'S BENYTTELSESFREKVENNS OG DE MEST BENYTTEDE METODER FOR HVER PARAMETER	7
2.1 Kimtall	7
2.2 Fluorescerende kim	10
2.3 Coliforme bakterier	10
2.4 Termostabile coliforme bakterier	11
2.5 Fekale streptococcer	12
2.6 <i>Clostridium perfringens</i>	12
2.7 Salmonellabakterier	13
2.8 Bifidobakterier	14
2.9 Coprostanol	14
3. SAMMENSTILLING AV INNKOMNE SVAR OG DISKUSJON AV METODIKKENE	15
3.1 Kimtall	15
3.2 Fluorescerende kim	19
3.3 Coliforme bakterier, kolonitellingsmetoder	19
3.4 Coliforme bakterier, MPN-metoder	22
3.5 Termostabile coliforme bakterier, kolonitellings- metoder	22
3.6 Termostabile coliforme bakterier, MPN-metoder	25
3.7 Fekale streptococcer	27
3.8 <i>Clostridium perfringens</i>	28
3.9 Salmonellabakterier	29
4. LITTERATUR	31

TABELLER

	Side
1 a. Metodevarianter og bruksområder for de forskjellige analyser	8
1 b. Prosent benyttelse ved laboratoriene i forhold til det totale antall på 43 laboratorier	9
2. Vekstmedier som benyttet i kimtallsanalyser	15
3. Oversikt over benyttede kimtallsmetoder	17
4. Bruksområdet for 37 °C kimtall	18
5. Oversikt over kolonitellingsmetoder i bruk for coliforme bakterier	20
6. Oversikt over MPN-metoder i bruk for coliforme bakterier	21
7. Oversikt over kolonitellingsmetoder i bruk for termostabile coliforme bakterier	23
8. Vekstmedier som benyttet til kolonitellingsmetoder for coliforme bakterier	24
9. Oversikt over MPN-metoder i bruk for termostabile coliforme bakterier	26
10. Oversikt over kolonitellingsmetoder i bruk for fekale streptococcer	27
11. Oversikt over metoder i bruk for <i>Clostridium perfringens</i>	28

FIGURER

1. Spørreskjema	6
-----------------	---

F o r o r d

Finansiert av Statens forurensningstilsyn, er NIVA nasjonalt referanselaboratorium for vannanalyser. Det var derfor naturlig at NIVAs representant i INSTA C12/AG17 Mikrobiologi, etter vedtak i arbeidsgruppen, tok initiativet til å utføre en rundspørring i Norge angående bakteriologiske analysemetoder i bruk for vann og slam. Spørreskjemaet ble utarbeidet og utsendt i juni 1981, med svarfrist 21.8.81. De svar som var innkommet innen svarfristens utløp er behandlet i denne rapport, mens fire svar som ble mottatt fra 2 til 4 uker senere ikke er kommet med. Svarene fra Island (se innledningen) er inkludert i tabellene, og bare når metodene er forskjellige fra dem som benyttes i Norge, er det angitt at svaret kommer fra Island.

Norges veterinærhøgskoles representant Gunnar Langeland i AG 17 har behandlet svarene og skrevet avsnittene om salmonellabakterier. Det resterende arbeidet er utført ved NIVA.

Rapporten er utformet slik at kapittel 2 har samlet alle opplysninger med størst relevans for arbeidet innen INSTA. Kapittel 3 inneholder alle detaljer i metodeutførelsen, og gir dessuten rettleiding til analyselaboratoriene angående utførelsen av metodene.

Rapporten sendes til alle de laboratorier som ble invitert til å delta i rundspørringen.

Blindern, oktober 1981

Kari Ormerod

1. INNLEDNING

De nordiske land Danmark, Finland, Norge og Sverige har siden 1970 gått sammen om å standardisere analysemetoder for vann. I de første årene inngikk bare kjemiske metoder i dette standardiseringsarbeidet. Fra 1976 kom også biologiske analysemetoder med. Standardiseringsarbeidet går i regi av de nordiske lands standardiseringsforbund, og styres av en nordisk komite, INSTA C 12. Selve standardiseringsarbeidet foregår i arbeidsgrupper.

Standardisering av bakteriologiske analysemetoder foregår i arbeidsgruppe 17 (forkortet AG 17). Norge har tre medlemmer i denne arbeidsgruppen: Cand. med. Jørgen Lassen ved Statens institutt for folkehelse (SIFF), som har spesielt ansvar for drikkevannsanalysene, siv.ing. Kari Ormerod fra NIVA, som har spesielt ansvar for forurenset vann, og cand. med. vet. Gunnar Langeland fra Norges veterinærhøgskole (NVH) fordi denne institusjonen utdanner de veterinærer som siden blir ansvarlige for utførelsen av bakteriologiske vannanalyser ved laboratoriene for næringsmiddelkontroll.

De fire deltakende land har forskjellige standardforskrifter for bakteriologisk analyse av drikkevann. Derfor ble det høsten 1980, på arbeidsgruppens årlige møte, bestemt at gruppen først skulle komme fram til felles standardmetoder for forurenset vann og kloakkslam.

En liste over aktuelle parametre og de prøvetyper som var aktuelle, ble utarbeidet på møtet. Til neste møte skulle de forskjellige land forsøke å få rede på hvilke av disse bakteriologiske analyser som var i vanlig bruk i landet, hvilke formål analysene ble brukt til og hvilke metoder som ble benyttet for de forskjellige parametre.

I Norge ble dette arbeidet startet ved at et spørreskjema ble utarbeidet, med listen fra arbeidsmøtet 1980 som modell. I listen og i skjemaet ble også en kjemisk indikator for fekal forurensning, coprostanol, inkludert. Siden dette var en fin anledning til også å undersøke i hvilken grad den norske standard for bakteriologisk drikkevannsanalyse, NS 4751, ble benyttet ved de forskjellige laboratorier, ble også drikkevannsparementene

Fluorescerende kimtall og Coliforme bakterier (37 °C inkubering) medtatt i spørreskjemaet, som er vist i figur 1.

Ved hjelp av adresselister over laboratorier som deltar i det ringtest-samarbeid som drives av NIVA, og med en adresseliste fra Norges veterinærhøgskole over næringsmiddelkontroll-laboratorier i Norge, kom man fram til 75 aktuelle laboratorier. Dette var vesentlig fylkeslaboratorier og næringsmiddellaboratorier, men også enkelte private laboratorier og spesiallaboratorier som de ved NVH, SIFF og NIVA.

Spørreskjema ble ikke sendt til statens medisinsk-mikrobiologiske laboratorier. SIFFs representant i AG 17 opplyste at kun få av disse utfører vannanalyser, og de er alle pålagt å følge Norsk Standard.

Spørreskjemaets hovedformål var å fremskaffe opplysninger om metoder benyttet til analyse av forurenset vann.

Et spørreskjema ble også sendt til Statens næringsmiddellaboratorium på Island, fordi en representant derfra hadde meldt sin interesse for deltakelse i standardiseringsarbeidet under et besøk på NIVA våren 1981. Svaret fra Island er inkludert i denne rapporten.

Det kom inn svar fra 45 laboratorier, det vil si at 60 % svarte på forespørselen. Av disse var det to laboratorier som svarte at de bare utførte kjemiske vannanalyser. Diskusjonen av svarene er delt i to. Første del, kapittel 2, tar for seg parametrenes benyttelsesfrekvens til de forskjellige prøvetyper, samt den mest benyttede analysemetode hvis en slik skiller seg ut.

De laboratoriene som svarte på spørreskjemaet bør få dra nytte av den informasjon de brakte tilveie. Derfor er detaljer i de forskjellige svar diskutert i kapittel 3, der også tilsynelatende feil og misforståelser med hensyn til metodene blir diskutert.

2. PARAMETRENE'S BENYTTELSESFREKVENNS OG DE MEST BENYTTETE METODER FOR HVER PARAMETER

I spørreskjemaet (figur 1) skulle laboratoriene krysse av for de prøvetyper som vanligvis ble analysert ved laboratoriet, blant de angitte prøvetyper drikkevann, badevann, resipientvann og slam. Betegnelsen slam var etter diskusjon i AG 17 ment å dekke de typer slam som er aktuelle i akvatisk miljø, vesentlig kloakkslam, men også slam og sedimenter fra vassdrag.

Parametrenes benyttelsesfrekvens for de forskjellige prøvetyper er sammenstilt i tabellene 1 a og 1 b. I tabell 1 a er antall laboratorier som benytter parametrene angitt, mens tabell 1 b angir det samme uttrykt som prosent av de 43 laboratorier som utførte bakteriologiske analyser. I tabell 1 a er også analysemetodene angitt.

For analysemetodene kimtall (20 °C), fluorescerende kim, coliforme bakterier (37 °C) og termotabile coliforme bakterier (44 °C) finnes det norske standardforskrifter (NS-4751). For disse parametrene er svarene systematisert etter om de er i overensstemmelse med standardforskriften, er variant av denne, eller er en annen metode.

2.1 Kimtall

Av 43 laboratorier utfører 42 analyser for 20 °C-kimtall. Av disse utfører 28 analysen ifølge Norsk Standard, 6 som variant av Norsk Standard, mens 8 laboratorier benytter andre metoder. Parameteren blir hyppig brukt til alle vanntyper, mens bare 7 % benytter den til slam.

Kimtall etter inkubering ved 37 °C regnes for å være en drikkevannsanalyse, men kan også være nyttig ved analyse av vann som skal benyttes i næringsmiddelindustri. Denne parameter var ikke medtatt på listen fra AG 17, men 21 % av laboratoriene oppga i spørreskjemaet at de benytter den for drikkevann, 12 % benytter den til badevann, men mindre enn 10 % benytter den til resipientvann og slam. Svarene for denne parameter er sammenstilt i tabell 4, og medtatt i tabell 1b.

For kimtallsanalyser vil forskjeller i inkuberingstemperatur og -tid ha stor innflytelse på resultatene. Skal analyser benyttes til å avgjøre om prøver fyller visse kvalitetskrav, er det et tydelig behov for en standardisering av metodene. Eventuelle kvalitetskriterier bør også relateres til fastlagte standard metoder.

Tabell 1a. Metodevarianter og bruksområder for de forskjellige analyser

Tabellen angir antall laboratorier som benytter vedkommende metodikk

Parameter	Metode	Bruksområde			
		Drikke- vann	Bade- vann	Resipient- vann	Slam
Kimtall 20 °C	Norsk standard	28	21	19	1
	Variant av NS [§]	6	5	6	0
	Annen metode	8	6	5	2
	SUM	42	32	30	3
Fluorescerende kimtall	Norsk standard	6	0	1	0
	Variant av NS	9	1	0	0
	SUM	15	1	1	0
Coliforme bakterier, MF-metoder	Norsk standard	29	22	23	3
	Variant av NS ^{&}	8	5	4	1
	Annen metode	2	1	1	1
	SUM	39	28	28	5
Coliforme bakterier, MPN-metoder	Norsk standard	27	22	21	3
	Annen metode	6	6	7	1
	SUM	33	28	28	4
Coliforme bakterier	Platemetoder	2	2	2	1
Termostabile coliforme bakterier, MF-metoder	Norsk standard	24	21	18	5
	Variant av NS ^{&}	4	5	5	1
	Annen metode	9	7	6	2
	SUM	37	33	29	8
Termostabile coliforme bakterier, MPN-metoder	Norsk standard	24	22	20	6
	Annen metode	6	8	7	7
	SUM	30	30	27	13
Termostabile coliforme bakterier	Platemetoder	1	1	3	3
Fekale streptococcer	37 °C Plate, MF	4	4	5	3
	44 °C Plate, MF	3	4	10	5
	37 °C MPN				1
<i>Clostridium perfringens</i>		7	3	12	12
Salmonella- bakterier	Kombinasjon A		1	4	15
	Kombinasjon B			1	2
	Kombinasjon C	1	1	2	4
	Kombinasjon D				1
	SUM	1	2	7	22
Bifidobakterier		0	0	0	0
Coprostanol		1	1	1	0
<p>§ Inkuberingstemperaturer opp til 30 °C og inkuberingstid mindre enn 72 timer er regnet som variant av Norsk standard. & Mediet "Endo Agar" er regnet som variant av Norsk standard.</p>					

Tabell 1b. Prosent benyttelse ved laboratoriene i forhold til det totale antall på 43 laboratorier

Parameter	Drikke- vann	Bade- vann	Resipient- vann	Slam
Kimtall 20 °C (20-30 °C)	98	74	70	7
Kimtall 37 °C Fra tabell 4	21	12	9	5
Fluorescerende kim	35	2	2	0
Coliforme bakterier 37 °C				
MF-teknikk	91	65	65	12
MPN-teknikk	77	65	65	9
Plate-teknikk	5	5	5	2,5
Termostabile coliforme bakterier				
MF-teknikk	86	77	67	19
MPN-teknikk	70	63	63	30
Plate-teknikk	2,5	2,5	7	7
Fekale streptococcer				
MF, plate, 37 °C	9	9	12	7
MF, plate, 44 °C	7	9	23	12
MPN 37 °C	0	0	0	1
<i>Clostridium perfringens</i>	16	7	28	28
Salmonellabakterier	2	5	16	51
Bifidobakterier	0	0	0	0
Coprostanol	2	2	2	0

INSTAs arbeidsgruppe 17 har allerede et forslag til standard for kimtall liggende klar, men den avventer et forslag fra ISO * angående anbefalte teknikker for bakteriologisk analyse. Forslaget skiller seg lite fra den norske standardmetoden. Det inkluderer både 20 °C- og 37 °C - kimtall, og analyse av ferskvann, brakkvann og saltvann. Dette er nærmere omtalt under 3.1.

2.2 Fluorescerende kim

Denne parameteren ble benyttet til analyse av drikkevann ved 35 % av laboratoriene. Meget få benyttet den til andre prøvetyper. En metode med spredeplateteknikk, som er å foretrekke fremfor den teknikk som er beskrevet i Norsk Standard, ble benyttet ved 60 % av disse laboratoriene.

2.3 Coliforme bakterier

Denne parameteren fremkommer ved inkubering ved 37 °C, og kalles også ofte for "totalantall coliforme bakterier". Den ble av AG 17 ikke medregnet blant parametrene for forurenset vann. Den er her medtatt som drikkevannsparameter. Analysen kan utføres etter to teknikkmessig helt forskjellige metoder, en MPN-rørmetode (MPN=most probable number) og etter kolonitellingsmetoder (membranfilter- og plate-metoder). Metoder som benytter MPN-teknikk og membranfilter (MF)-teknikk er beskrevet i Norsk Standard både for coliforme og termostabile coliforme bakterier.

De fleste laboratorier (over 81 %, tabellene 5 og 6) benytter begge teknikker for coliforme bakterier, med svak overvekt mot membranfiltermetoder. Bare 5 % benytter platemetoder. Membranfiltermetoder blir også benyttet til analyse av slam, selv om denne metodikk ikke er beregnet for vann typer som inneholder større mengder partikler. MPN-metoder blir altså ikke benyttet hyppigere for denne analysen av slam enn MF-metodene, til tross for at MPN-metodikk er bedre egnet til formålet.

De fleste laboratorier utfører begge metodene ifølge Norsk Standard, eller som varianter av denne. Andre MF-metoder blir benyttet ved to, og andre MPN-metoder ved åtte laboratorier.

* International Organization for Standardization

Parameteren benyttes hyppigst for drikkevann, også hyppig for badevann og resipientvann, men bare få laboratorier benytter den på slam.

2.4 Termostabile coliforme bakterier

Denne parameteren fremkommer ved inkubering ved 44,0 eller 44,5 °C, og kalles også "Termotolerante" eller "Fekale" coliforme bakterier. Parameteren er i bruk i alle laboratoriene, og de fleste utfører begge metodikk-varianter. Langt flere laboratorier benytter denne enn den foregående parameter til slamprøver. MPN-teknikk er her foretrukket fremfor MF-teknikk til analyse av slam, men til vannprøver benytter flere laboratorier MF-teknikk enn MPN-teknikk.

De fleste laboratorier utfører både MF- og MPN-metoden for denne parameter ifølge Norsk Standard eller varianter av standarden. Seks laboratorier benytter en MF-metode med det amerikanske vekstmedium m-FC. Mange laboratorier benytter en alternativ MPN-metode i tillegg til den som er beskrevet i Norsk Standard.

En membranfiltermetode for denne parameteren vil være velegnet til karakterisering av generell vannkvalitet, da disse metodene er enkle og kostnadmessig rimelige i utførelse. Til meget forurenset vann, slam og sedimenter kan det istedenfor membranfilter benyttes plateteknikk, med likeverdig resultat.

De forskjellige vekstmedier som benyttes med MF- og plateteknikk, gir ikke alltid likeverdige resultater. Eventuelle kvalitetskrav bør derfor knyttes til en standard metode (eventuelt til flere metoder som i praksis har vist seg likeverdige). Ifølge nåværende Norsk Standard skal man som membranfiltermetoder i drikkevannsanalyser benytte "m-Endo Broth" eller "m-Endo Agar LES", med inkubering ved 37 °C for coliforme bakterier og ved 44 °C for termostabile coliforme bakterier. Av grunner som er diskutert under punkt 3.5 bør parameteren med inkubasjonstemperatur 44 °C på dette medium ikke benyttes alene, men bare i par med et filter inkubert ved 37 °C.

Den membranfiltermetode, med m-FC-medium, som er valgt som standard for drikkevann i Finland og Sverige, og som også er meget utbredt i USA, kan benyttes alene og egner seg utmerket til formålet. Metoden kan også utføres som plateteknikk. Det er derfor nærliggende å foreslå denne som standard for generell vannkvalitetsbedømmelse i de nordiske land.

2.5 Fekale streptococcer

For parameteren Fekale streptococcer er kolonitellingsmetoder de langt vanligste. Bare ett laboratorium har innarbeidet MPN-metode til dette formål, og benytter den bare til slam og sedimenter. I alt 20 laboratorier (46 %) benytter denne parameteren til de her omtalte prøvetyper. 40 % av laboratoriene (17 stk.) benytter parameteren for resipientvann, 21 % (9 stk.) for drikkevann og badevann, og 17 % (8 stk.) til slam. Noen av laboratoriene rapporterte imidlertid at de sjelden benytter den til drikkevann, badevann og slam, men de er medregnet i de foregående prosenttall.

Parameteren blir altså mest benyttet til resipientvann. Tabellene 1 a og 1 b viser at de fleste benyttet direkte inkubering ved 44 °C. Dette er bedre belyst i tabell 10. Av de 20 norske laboratorier som utførte analysen, benyttet halvparten direkte inkubering ved 44 °C i 48 timer.

Etter dette er det nærliggende for Norge å foreslå som standard metode for fekale streptococcer, til bruk i generell vannkvalitetsbedømmelse: Kombinert membranfilter- og plateteknikk med Slanetz & Bartley agar (m-Enterococcus agar), og direkte inkubering ved 44 °C i 48 timer.

2.6 Clostridium perfringens

Ved de benyttede metoder med pasteurisering selekteres anaerobe, eller fakultativt anaerobe, sulfittreducerende sporedannere. *C. perfringens* er en slik bakterie som stammer fra fekalier, og kan derfor brukes som indikator på fekal forurensning. Parameteren utføres ved 16 laboratorier (32 %), men to av disse rapporterte at den sjelden er i bruk. 28 % av laboratoriene benyttet parameteren til slam og resipientvann, 16 % til drikkevann og 7 % til badevann (tabellene 1 a og 1 b).

Jernsulfittagar med kolonitellingsteknikk er den mest benyttede metode i Norge, se kapittel 3.8. To laboratorier er gått over til å bruke et næringsmedium som er mye benyttet til analyse for samme parameter i næringsmidler, Shahidi-Ferguson Perfringens agar, eller en variant av denne, Tryptose Sulfitt Cycloserin agar (TSC-agar).

Jernsulfittagar krever en inkuberingstemperatur på 48 °C dersom den skal være selektiv nok for *C. perfringens* fra vannprøver. Ved bruk av den selektive TSC-agar kan inkuberingstemperatur på 44 °C benyttes, slik at man ikke trenger en ekstra inkubator til denne analysen.

På Island benyttes en MPN-metode med "Differensial reinforced clostridial medium" (DRC-medium), som er utarbeidet i Storbritannia. Den tar lenger tid og er mer arbeidskrevende enn metodene med kolonitellingsteknikk, fordi metoden krever et konfirmeringstrinn etter DRC-medium-analysen.

Dersom det ikke er et stort behov for raskt å få ut en standard metode for denne parameter, foreslås det fra norsk side at metoden med TSC-agar utprøves i de nordiske land før det fremmes forslag til standard metode.

2.7 Salmonellabakterier

Analyse for salmonellabakterier blir utført ved 56 % av laboratoriene (24 stk). To av disse utfører analysen bare for fiskemel og slakteriavløpsvann. Av de øvrige norske laboratorier rapporterte 21 at de benytter parameteren for kloakkslam, 6 benytter den for resipientvann og 1 for badevann.

Island benytter analysen til alle prøvetypene. Enkelte norske laboratorier rapporterte at analysen sjelden blir brukt til enkelte av prøvetypene. Dette gjelder bl.a. for badevann. De to laboratoriene som utfører analysen på henholdsvis fiskemel og slakteriavfall, har den følgende også i beredskap for slam og vann, men deres metodikk er ikke medtatt i den etterfølgende diskusjon.

Bare ett av laboratoriene benytter den metodikk som er anbefalt av Nordisk metodikk-komite for næringsmidler (Nr. 71, 2. utg., 1975). Den benyttede metodikk er inndelt i fire kategorier, A, B, C og D (for detaljer se under punkt 3.9).

Av de 22 laboratorier som utfører analysen på slam og vann benytter 15 tilnærmet samme metodikk, kategori A. Denne består av oppformering i selenittbuljong ved 41,5 °C og primærisolasjon på brilliantgrøntagar

inkubert ved 37 °C. Denne metodikk er utvilsomt langt mer effektiv enn metodikken beskrevet i Nordisk metodikk-komite for næringsmidler, og vil for Norges vedkommende være den mest nærliggende metodikk å anbefale som standard metode. De andre kategorier, og metoder for diagnostikk, er kommentert under 3.9.

2.8 Bifidobakterier

Ingen av laboratoriene utfører analyse for Bifidobakterier.

2.9 Coprostanol

Ett av laboratoriene benytter coprostanolanalyser for alle typer vannprøver, men har ikke forsøkt å analysere slam. Utprøving av analysemetoden på vannprøver er beskrevet i ref. 3.

3. SAMMENSTILLING AV INNKOMNE SVAR OG DISKUSJON AV METODKKE NE

3.1 Kimtall

Svarene er skjematiskert i tabellene 3 og 4. Av 43 laboratorier utfører 28 (65%) analysen for drikkevann ifølge Norsk Standard. Ytterligere to laboratorier oppga at de følger Norsk Standard, men dette medfører ikke riktighet fordi de benytter et annet vekstmedium enn det som er beskrevet i standarden. I tabell 1a er laboratoriene gruppert etter om de følger standarden, benytter en variant av denne, eller en helt annen metode. Det viser seg at 8 laboratorier benytter en annen metode for drikkevann.

Metoder som inkluderer et annet vekstmedium enn det som er beskrevet i standarden, kommer i rubrikken "annen metode". Difcos "Plate Count Agar" var det mest benyttede medium i denne kategorien (tabell 3). Ett laboratorium benyttet imidlertid membranfiltermetode med Difcos medium Bacto m-TGE Broth til kimtallsanalysen.

Tabell 2. Vekstmedier som benyttes i kimtallsanalyser

Stoff	GRAM PR. LITER			
	Norsk Standard NS-4751	Difco Nutrient Agar No. 0001	Difco Nutrient Agar, 1,5% No. 0069	Difco Plate Count Agar No.0479
Gjær ekstrakt				2,5
Kjøtt ekstrakt	3	3	3	
Pepton	5	5	5	
Trypton				5
Glucose				1
NaCl			8	
Agar	15	15	15	15
pH	7,0	6,8	7,3	7,0

Enkelte av laboratoriene som oppga at de utfører analysen ifølge Norsk Standard, oppga at de benytter mediet "Nutrient agar". Det er flere ulike medier som produseres under dette navn, så det er nødvendig å kontrollere at produktet tilsvarer mediet oppgitt i Norsk Standard før det tas i bruk.

Norsk Standard oppgir Difcos "Nutrient Agar nr. 0001" som likeverdig medium, se tabell 2. Bemerk at pH-verdien da må justeres fra 6,8 til 7,0. Tabell 2 viser også at Difco har to produkter med navn "Nutrient Agar". Det ene inneholder koksalt, men det har et annet katalognummer, slik at de kan skilles ad ved bestilling. Difcos medium "Plate Count Agar" inneholder glucose og pepton (trypton), og det skal derfor ikke autoklaveres normalt (121°C i 15 min.). Hvis man utsetter det for denne steriliseringsprosedyre, kan glucosen sammen med pepton danne stoffer som er giftige for bakterier. Dette er en gammel erfaring som stadig blir glemt og gjenoppdaget, antagelig fordi produsentene av dehydrerte bakteriemedier ikke er oppmerksomme på dette når de angir steriliseringsprosedyren på etiketten. "Plate Count Agar" skal gi omtrent samme resultat som "Nutrient Agar 0001" når førstnevnte blir korrekt preparert, men ulempene med spesialsterilisering gjør at man som Norsk Standard valgte et medium tilsvarende "Nutrient Agar 0001".

I tabell 3 er det gitt en oversikt over de forskjellige variantene av de benyttede kimtallsmetoder. Tabellen viser at flere laboratorier som benytter en form for "nutrient agar" (NA), benytter en annen inkuberings-tid enn 72 timer som er angitt i standarden, og fire laboratorier benytter en temperatur på 30°.

Ved analyse av vann er 20°C-kimtall og 37°C kimtall forskjellige parametre.

Ved 20°C-kimtallanalyse ønsker man å bestemme antallet av aerobe, og fakultativt anaerobe heterotrofe sopp og bakterier som er istand til å formere seg i naturlige vannmasser. De fleste slike organismer har temperaturoptimum mellom 10-20°C, men en del av dem vokser godt i løpet av 3 døgn også opptil 28°C. Over denne temperatur synker antallet meget raskt.

Ved å inkubere ved 37°C ønsker man å bestemme antall organismer som vokser raskt ved høy temperatur. Slike organismer kan stamme fra fekalier

Tabell 3. Oversikt over benyttede kimtallsmetoder

Tilsiktet bakterie-gruppe	Inkuberingsbetingelser		Medium	Antall laboratorier
	°C	Timer		
Bakterier som formerer seg i ferskvann	20	72	NA	28
	20	72	PCA	6
	20	72	m-TGE MF	1
	20	48	NA	2
	20	36	NA	1
Som ovenfor?	30	72	PCA	1
	30	72	NA	1
	30	48	NA	2
Bakterier i kloakkvann og spesielle industriavløpsvann	37	48	NA	4
	37	48	PCA	2
	37	72	NA	1
	37	72	m-TGE MF	1
	37	24	PCA	1 (Island)

og fra spesielle industriutslipp (Ref. 1). De finnes også i små mengder i jord og vann, men formålet her er å bestemme antall organismer som ikke stammer fra naturlige vannmasser. I norske kvalitetskrav til vann (Ref. 2), er det for "Vann for omsetning", i tillegg til 20°C-kimtall, satt krav til innholdet av 37°C - 2 døgns kimtall i det vannet som skal fylles på salgsemballasjen.

I norske kvalitetskrav til vann er det ingen spesifiserte krav for 30°C kimtall. Denne inkuberingstemperaturen benyttes vanligvis ikke for kimtall i vannprøver. Det antas imidlertid at denne parameter gir resultater som ligger nærmere 20°C enn 37°C kimtall, og parameteren er derfor i denne rapport medtatt blant resultatene for 20°C kimtall.

Metodene for 37°C kimtall er sammenstilt i tabellene 3 og 4, og i tabell 4 er også bruksområdet medtatt. Parameteren blir benyttet til alle vann-typer og slam, men mest til drikkevann.

Tabell 4. Bruksområdet for 37 °C kimtall

Tabellen angir antall laboratorier som benytter vedkommende metodikk

Inkuberingstid i timer	Medium	Bruksområde			
		Drikke- vann	Bade- vann	Resipient- vann	Slam
72	Bacto m-TGE broth	1	1	1	0
72	NS-4751	1	0	0	0
48	NS-4751	5	2(+1)	1(+1)	1
48	PCA	1	1	1	1
24	PCA	1	0	0	0
Tilsammen		9	5	4	2

I Standardiseringsarbeidet for vannanalyser innen de nordiske land (INSTA), er det utarbeidet et forslag til standard for kimtallsmetoder. Vekstmediet ligner på det som er angitt i NS-4751, men kjøtttekstrakt er av praktiske grunner byttet ut med gjærekstrakt.

Foreslått medium:

Pepton, pankreatisk nedbrudt kasein (f.eks. Difcos Bacto-Tryptone)	6 g
Agar	15 g
Destillert vann, brakkvann eller sjøvann	til 1 liter
pH-verdi	7,0 [±] 0,1

Variant 1 : 20 [±] 1 °C i 72 [±] 3 timer

Variant 2 : 35-37 °C i 48 [±] 2 timer.

Når teknikkdelen av metodestandardiseringen er ferdig utarbeidet, vil forslaget til standard for kimtallsanalyse av vann bli sendt ut til kritikk.

Det er derfor interessant å sammenligne dette forslag med tabell 3, som viser at 34 laboratorier, eller 81% av dem som utfører 20-30°C kimtall, allerede benytter 20°C - 72 timers inkubering, og 6 stk., eller 67 % av laboratoriene som utførte 37°C kimtall benytter 48 timers inkubering.

3.2 Fluorescerende kim

Seks laboratorier oppga at de utfører analysen ifølge NS-4751, det vil si: Kongs agar B, innstrøpningsplate, 20°C i 72 timer.

Ett laboratorium henviste til NS-4751, men oppga inkuberingstiden til 48-72 timer.

De resterende ni laboratorier utfører analysen med spredeplateteknikk, men ellers lik standard metoden. Dette er korrekt ifølge Kings opprinnelige publikasjon, da det bare er overflatekolonier som fluorescerer. Ulempen med denne teknikk er at bare 0,1 ml prøvevolum kan benyttes pr. plate dersom ikke platene spesialtørkes på forhånd.

Det er sjelden så høy konsentrasjon av fluorescerende kim i drikkevann at de lar seg påvise i 0,2 ml vannprøve (2 plater, ifølge Norsk Standard). Det ville derfor være en fordel om vekstmediet kunne bli optimalisert for bruk med membranfilter.

3.3 Coliforme bakterier, kolonitellingsmetoder

Svarene er skjematiskert i tabell 5.

Herunder inkluderes våde membranfilterteknikk, som blir benyttet ved 91% av laboratoriene, og innstøpnings- og spredeplateteknikk, som blir benyttet ved 5% av laboratoriene. Av de 39 laboratorier som utfører membranfiltermetoder for drikkevann, oppgir 29, eller 67%, at de følger Norsk Standard. Noen laboratorier oppga at de følger standarden, og at de benytter "Endo agar" som vekstmedium. Denne metoden blir i denne rapport regnet som "variant" av Norsk Standard. Noen få laboratorier oppga at de benytter forskjellige MPN-metodebuljonger med membranfilterteknikk. Vekstmediets betydning for resultatene blir diskutert felles for coliforme og termostabile coliforme bakterier under 3.5

For innstøpnings- og spredeplatemetodene ble rødviolett galleagar (RVG-agar) og laktose-bromthymolblåttagar (blåskål, Drigalskiagar) oppgitt som vekstmedier.

Tabell 5. Oversikt over kolonitellingsmetoder i bruk for coliforme bakterier
 Tallene under "Bruksområde" angir antall laboratorier som benytter vedkommende teknikk

Teknikk	Medium	Antall Laboratorier	Bruksområde			
			Drikke- vann	Bade- vann	Resipient- vann	Slam
MF	m-Endo Broth eller m-Endo Agar LES	29	29	22	23	3
	Endo Agar	8	8	5	4	1
	MacConkey medium	1	1	1	1	1
	Lactose buljong	1	1			
	SUM	39	39	28	28	5
Plate	Rødviolett-galle agar	1	1	1	1	1
	Lactose-bromthymolblått agar	1	1	1	1	
	SUM	2	2	2	2	1

Tabell 6. Oversikt over MPN-metoder i bruk for coliforme bakterier

Tallene under "Bruksområde" angir antall laboratorier som benytter vedkommende teknikk

Medium	Antall laboratorier	Bruksområde			Slam
		Drikke-vann	Bade-vann	Resipient-vann	
Lactosebuljong + Brilliantgrøntbuljong	27	27	22	21	3
MacConkey buljong	5	4	3	4	1
Lauryl tryptose buljong (Lactose laurylsulfat buljong)	1		1	1	
Lactose buljong	2	2	2	2	
SUM	35	33	28	28	4

3.4 Coliforme bakterier, MPN-metode

Svarene er skjematisert i tabell 6.

Standarden blir fulgt av 63% av laboratoriene. Flere laboratorier benytter forskjellige metoder for drikkevann og de andre nevnte prøvetyper. Variantene fremkommer i tabell 6. MacConkey buljong er i bruk ved 12% av laboratoriene.

3.5 Termostabile coliforme bakterier, kolonitellingsmetoder

Svarene er skjematisert i tabell 7.

Membranfilteranalyser blir benyttet ved 95% av laboratoriene, og 63% benytter Norsk Standard metode.

Fem laboratorier benytter varianter (Endo medium) av denne metode, mens ni laboratorier benyttet andre metoder.

Seks laboratorier benytter det amerikanske M-FC-medium med membranfilterteknikk.

Dette medium benyttes også med plateteknikk av ett laboratorium. RVG-agar ble også benyttet med plateteknikk.

Plateteknikk ble benyttet ved 4 laboratorier, mest til resipientvann og slam.

Vekstmediet betyr mye for resultatet av analysen. De forskjellige varianter av Endo agar er ikke likeverdige når membranfilterteknikk benyttes. Den opprinnelig Endo agar var beregnet på overflatekolonier eller utstryk, og med en inkuberingstemperatur på 37°C. Dette mediet er blitt modifisert for bruk med membranfiltre av cellulosenitrat eller cellulose-estere. Forskjellige membranfiltre absorberer næringsstoffer, selektive ingredienser og fargeindikatorer i forskjellig grad, slik at det er viktig å optimalisere vekstmedier med hensyn til den type membranfilter som skal benyttes. Man kan derfor ikke uten videre benytte et selektivt medium for en plate - eller rør-metode som medium for membranfilterteknikk.

Tabell 7. Oversikt over kolonitellingsmetoder i bruk for termotabile coliforme bakterier
 Tallene under "Bruksområde" angir antall laboratorier som benytter vedkommende teknikk

Teknikk	Medium	Antall laboratorier	Bruksområde			
			Drikke- vann	Bade- vann	Resipient- vann	Slam
MF	m-Endo Broth eller m-Endo Agar LES	27	24	21	18	5
	Endo Agar	5	4	5	5	1
	m-FC medium (Broth eller Agar)	6	6	5	4	1
	Brilliantgrønt-medium	1	1		1	
	Laktose gallesalt medium	1	1	1		1
Plate	Brilliantgrønt-lactose-gallesalt buljong + Indolmedium	1	1	1	1	
	SUM	41	37	33	29	8
Plate	M-FC Agar	1			1	1
	Rødviølett-galle agar	2	1	1	2	2
	SUM	3	1	1	3	3

Det Endo-medium som er spesielt utviklet for membranfilterteknikk er angitt i NS-4751, og et firmamerke for to likeverdige, dehydrerte produkter er også angitt. Dette er mediene med katalog nr. 0749 og 0736 i tabell 8. Difcos Endo Agar nr. 0006 er ikke likeverdig med de to andre, og erfaringsmessig gir den mange "falske positive" kolonier. Dette medium skal ikke benyttes med membranfilterteknikk. Heller ikke MPN-rørmetodebuljong kan benyttes, fordi positiv reaksjon i disse også er avhengig av at gassproduksjon blir registrert, og mediets sammensetning er heller ikke optimalisert for bruk med membranfilter.

Tabell 8. Vekstmedier som benyttes til kolonitellingsmetoder for coliforme bakterier

Stoffer angitt i DIFCOs katalog	GRAM PR. LITER		
	m-Endo Broth MF No. 0749	m-Endo Agar LES No. 0736	Endo Agar No. 0006
Peptone			10
Casitone	5	3,7	
Thiopeptone	5	3,7	
Tryptose	10	7,5	
Gjær ekstrakt	1,5	1,2	
Lactose	12,5	9,5	10
Sodium desoxycholate	0,1	0,1	
Dipotassium phosphate	4,375	3,3	3,5
Monopotassium phosphate	1,375	1,0	
Sodium chloride	5	3,7	
Sodium lauryl sulfat	0,005	0,005	
Sodium sulfite	2,1	1,6	2,5
Basic fuchsin	1,05	0,8	0,4
Agar	0	15	15

Bruk av 44°C som inkuberingsstemperatur for Endo medium er også et omdiskutert tema. Undersøkelser har vist at resultatene da blir svært påvirket av små variasjoner i temperatur og i mediets sammensetning. I Norsk Stan-

dard er det en forutsetning at 37°C og 44°C inkubering brukes sammen, aldri 44°C alene. Hensikten er raskt å kunne avgjøre med større sikkerhet om påviste 37°C-colibakterier stammer fra jord eller ferske fekalier. Det er da antatt at ferske fekalier vil gi positivt utslag i 44°C-analysen.

Mediet m-FC buljong eller -agar er spesielt utarbeidet for membranfilteranalyse og inkubering ved 44-44,5°C, og egner seg også til plateteknikk. Det er valgt som medium for membranfilterteknikk til analyse av drikkevann i Finland og Sverige, og er også vidt utbredt til analyse av forurenset vann i land som følger USA's metoder.

Valg av metode vil også her influere på resultatet. Ved analyse av drikkevann må man velge metoder som med stor sikkerhet kan påvise fekale bakterier som kan ha overlevd en behandlingsmetode eller har trengt inn i et distribusjonsnett. Ved valg av metode for generell vannkvalitetsbedømmelse kan man nøye seg med å fastsette konsentrasjonsnivå, og kan velge enklere metoder.

De laboratorier som benytter "Endo Agar" anbefales å kontrollere om de bruker korrekt type medium dersom de ønsker å analysere ifølge Norsk Standard 4751.

3.6 Termostabile coliforme bakterier, MPN-metoder

Svarene er skjematiskert i tabell 9. Denne teknikk blir benyttet ved 79% av laboratoriene, og 56% følger Norsk Standard. Dette var den mest benyttede teknikk for slam, 30% benyttet den, mot 19% for MF-teknikk og 7% plateteknikk. Blant de laboratorier som benyttet metoden i Norsk Standard var det noen som hadde små avvik i inkuberingsbetingelsene. Majoriteten av dem som ikke bruker standard metoden bruker MacConkey buljong, enten direkte ved 44 °C eller som presumtiv test etterfulgt av konfirmativ test med brilliantgrøntbuljong. Den engelske tradisjon med MacConkey-buljong som er standard i Danmark, men er på vei ut i England, er altså fremdeles mye brukt i Norge. I England benyttes "Glutamic acid medium" i presumtiv test, etterfulgt av konfirmativ test i "2% brilliantgrønt buljong", eller "Lactose ricinoleate buljong", og indoltest-buljong.

Tabell 9. Oversikt over MPN-metoder i bruk for termostabile coliforme bakterier

Tallene under "Bruksområde" angir antall laboratorier som benytter vedkommende teknikk

Medium	Antall laboratorier	Bruksområde			
		Drikkevann	Badevann	Resipientvann	Slam
Lactosebuljong + Brilliangrøntbuljong og Indolmedium, 44 °C	24	24	22	20	6
som ovenfor - Indolmedium	1 (Isl.)	1	1	1	1
MacConkey-buljong + Brilliantgrøntbuljong 44 °C	1				1
MacConkey-buljong 44 °C	5	3	4	4	3
Lactose gallesalt buljong 44 °C	2	2	2	1	1
Lactose laurylsulfat buljong 37 °C + Lactose gallesalt buljong 44 °C	1		1	1	1
SUM	34	30	30	27	13

Island benytter nesten samme MPN-metode som Norge, men de har ikke med indol-testen i konfirmativ test for termostabile coliforme bakterier.

3.7 Fekale streptococcer

Svarene er skjematisert i tabellene 10, 1a og 1b. Av de 21 laboratorier som oppga at de utfører analysen, er det ett som ikke utfører den rutinemessig. Dette laboratorium oppga ingen metode. Alle de andre laboratoriene benytter membranfiltrerteknikk, og noen også plateteknikk for slam og forurenset vann. Bortsett fra Island, som benytter KF-agar, benytter alle de norske laboratorier Slanetz & Bartley agar eller Difcos m-Enterococcus agar, som er identiske vekstmedier. To av laboratoriene oppga ikke inkuberingsbetingelsene. Av de resterende laboratorier benytter fem inkubering ved 37 °C, ti ved 44 °C og tre begge deler. Inkuberingstiden er vist i tabell 10.

Tabell 10. Oversikt over kolonitellingsmetoder i bruk for fekale streptococcer

Inkuberingsbetingelser		Antall laboratorier som benytter metodene	
Temperatur °C	Timer	Slanetz & Bartley agar Norge	KF-agar Island
37	24	2	
37	48	2	
37	24 - 48		1
44	48	10	
37 og 44	24 - 48	1	
37 og 44	48	2	
Ikke oppgitt		2	

Ett laboratorium har innarbeidet rutine for MPN-metode for denne indikatorbakterie i slam og sedimenter. Presumptivt medium er Glucose azid buljong og konfirmativt medium Glucose azid ethylviolett buljong.

3.8 Clostridium perfringens

Av de femten laboratorier som utfører analysen, rapporterte ett at den sjelden er i bruk. To laboratorier analyserer for vegetative celler såvel som for sporer, de andre bare for sporer. Island benytter den engelske MPN-metode med DRC-medium, 42 °C i 24-120 timer. Majoriteten av de norske laboratorier benytter jernsulfitt-medium med en eller annen form for kolonitellingsteknikk: Innstøpning i rør eller skåler, eller membranfiltrerteknikk. Ett av disse benytter MPN-teknikk med dette vekst-medium. Ett laboratorium benytter Difcos "Cooked Meat Medium" og "Shahidi Ferguson Perfringens Agar", og ett benytter en modifikasjon av sistnevnte: "Tryptose Sulfitt d-Cycloserin agar" (TSC-agar). Detaljer angående vekstmedier og inkuberingsbetingelser er vist i tabell 11.

Det laboratorium som benytter TSC-agar inkubert anaerobt ved 44 °C i 18-24 timer, bedømmer denne metode som meget velegnet til analyse av vannprøver og slam.

Tabell 11. Oversikt over metoder i bruk for Clostridium perfringens

Antall laboratorier	Medium					Teknikk		Inkuberingsbetingelser	
	TSC-agar	Ferguson Shahidi Perfringens agar	Cooked meat medium	Jernsulfitt medium	DRC-medium	MF, innstøpning plate og rør	MPN	°C	Timer
1		x	x			x		37	48
1				x		x		37	48
1				x		?		37	24 - 48 - 72
1				x		x		37	48 - 72
<hr/>									
1				x		x		37	24 - 48
<hr/>									
1					x		x	44	24 - 48
1	x							42	24 - 120
1						x		44	18 - 24
2				x		x		44	24
1				x		x		44	48
3				x		x		48	24
1				x			x	?	?
1				x		?		?	?
1	Sjelden i bruk, ikke oppgitt detaljer								

3.9 Salmonellabakterier

Svarene angående bruksområde er medtatt i tabellene 1 a og 1 b. Analysemetodene ved de 22 laboratorier som utførte analysen for vann og slam, ble systematisert i fire kategorier.

Ingen av laboratoriene preinkuberer prøvene i fosfatbuffret peptonvann e.l.

Kategori A:

Femten av laboratoriene oppformerer i selenittbuljong ved 41,5 °C og foretar primærisolasjon på brilliantgrønt-agar (BGA) som inkuberes ved 37 °C.

Syv laboratorier sår ut til BGA etter både 2 og 3 døgns inkubering av selenittbuljongen, 3 laboratorier sår ut etter 2 døgn, 4 laboratorier etter 1 og 2 døgn, og ett laboratorium sår ut til BGA etter både 2, 3 og 4 døgns inkubasjon av selenittbuljongen.

Kategori B:

To laboratorier oppformerer i kaliumtetrathionatbuljong og foretar primærisolasjon på bromthymolblått-laktose agar (blåskål) som inkuberes ved 37 °C i 1 døgn.

Det ene inkuberer kaliumtetrathionatbuljongen ved 37 °C og sår ut til blåskål etter 1 og 3 døgn. Det andre oppformerer ved 41,5 °C og sår ut etter 1 og 2 døgn.

Kategori C:

Andre metoder enn kategori A, B og D. Fire laboratorier kom inn under denne kategori. To av disse oppformerer i selenittbuljong ved 37 °C og sår ut etter 1, 2 og 3 døgn. Det ene utførte primærisolasjon på BGA ved 37 °C i 18-20 t, det andre på blåskål ved 37 °C i 1 døgn.

Ett laboratorium inkuberer i selenittbuljong ved 43 °C og sår ut til BGA etter 1 og 2 døgn. BGA inkuberes ved 37 °C i 1 døgn. Island kommer også inn under denne kategori. Der benyttes både 0,5 % Lactose Broth TT Hajna (37 °C i 24 timer) og selenittbuljong (42 °C i 24 og 48 timer) til oppformering, og BGA og vismutsulfittagar, begge ved 37 °C i 24 timer, til primærisolasjon.

Kategori D:

Ett laboratorium kom inn under denne kategori. Der blir det benyttet både selenittbuljong (41,5 °C i 1 døgn) og K-tetrathionatbuljong (37 °C i 1 døgn) til oppformering, og primærisolasjonen foregår på BGA ved 37 °C i 1 døgn.

— 0 — 0 —

Ved å se alle kategorier for de norske laboratoriene under ett, finner man at 18 av 21 laboratorier (86 %) oppformerer i selenittbuljong, 2 oppformerer i kaliumtetrathionatbuljong, og 1 laboratorium benytter begge parallelt.

Primærisolasjonen foregår ved 18 laboratorier på brilliantgrøntagar, ved 3 laboratorier på blåskål.

Til videre diagnostikk benyttes det mange metoder, som oftest flere parallelt:

BGSA (Brilliantgrønt-sorbitol-fenolrødt agar),
BGA + S (Brilliantgrønt agar tilsatt 2 % sorbitol),
TSI (Triple Sugar Iron agar), indol, serum, LDC (Lysin Decarboxylase),
polyvalent salmonellaserum I, trerørsforgjæring ifølge Lassen (5).

Av de 21 norske laboratorier benytter 13 (62 %) BGSA eller BGA + S til diagnostikk, de fleste med inkubering ved 37 °C i 1 døgn.

4. LITTERATUR

1. ORMEROD, Kari. BAKTERIOLOGISK UNDERSØKING AV VANN. Kintallsundersøking og hygienisk betydning av dette. Vann nr. 1b, 1979, 14. årgang.
2. KVALITETSKRAV TIL VANN. Drikkevann - Vann for omsetning - Badevann. Rev. utgave nov. 1976. Sosialdepartementet - Helsedirektoratet, ved sanitærkjemisk avdeling, Statens institutt for folkehelse. Statens trykksakekspedisjon 1-2026.
3. BERGLIND, Lasse, og Kari Ormerod. PÅVISNING AV FEKALE FORURENSNINGER I VANN. Bakteriologiske og kjemiske indikatorer. NIVA rapport XK-20, Oslo september 1979
4. BONDE, Gunner J. Bacterial Indicators og Water Pollution. A Study of Quantitative Estimation. Teknisk forlag, Copenhagen 1963.
5. LASSEN, Jørgen. Rapid identification of gram negative rods using a three-tube method combined with a dichotomic key. Acta path. microbiol. scand. Sect. B, 83, 525-533, 1975.